

Departement für Nutztiere, Klinik für Fortpflanzungsmedizin  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor ad interim: Prof. Dr. Dr. h.c. U. Braun

Arbeit unter Leitung von Dr. Erika Michel, Dipl. ECAR

**Expression von Prolaktin-Rezeptoren im kaninen gesunden  
Mammagewebe, in kaninen Mammaadenomen und  
Mammaadenokarzinomen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Stefanie Kathrin Feldmann**

Tierärztin  
von München, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. Iris Margaret Reichler, Referentin

Prof. Dr. Franco Guscelli, Korreferent

Zürich 2011



Meinen Eltern und meinen Geschwistern gewidmet



# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis .....	3
2	Zusammenfassung .....	5
3	Einleitung.....	7
3.1	Prolaktin und der Prolaktinrezeptor .....	7
3.1.1	Prolaktin .....	7
3.1.2	Prolaktin-Wirkung.....	7
3.1.3	Regulation der Prolaktin-Freisetzung .....	8
3.1.4	Prolaktin-Blutspiegel beim Hund .....	9
3.1.5	Prolaktinrezeptor .....	10
3.2	Bedeutung von Prolaktin in der Brustkrebsentstehung beim Menschen ....	11
3.2.1	Historische Perspektive.....	11
3.2.2	Neue Erkenntnisse .....	11
3.3	Mammatumoren beim weiblichen Hund .....	15
3.4	Bedeutung von Prolaktin in der Mammatumorentstehung beim Hund .....	16
4	Material und Methoden.....	18
4.1	Untersuchungsgut .....	18
4.2	Gewinnung und Fixation des Gewebematerials .....	18
4.3	Auswahl der Proben .....	18
4.4	Anfertigung der Stanzbiopsien .....	19
4.5	Anfertigung der Gewebeschnitte für die Untersuchungen .....	19
4.6	Färbung der Schnittpräparate für die lichtmikroskopische Untersuchung ..	19
4.7	Durchführung der semi-quantitativen Real Time PCR.....	20
4.7.1	RNA-Extraktion .....	20
4.7.2	Bestimmung der RNA-Konzentration .....	20
4.7.3	DNase-Behandlung .....	20
4.7.5	Quantitative Real Time (TaqMan) PCR.....	22
4.7.6	Quantifizierung der Real Time PCR .....	23
4.7.7	Statistische Auswertung der Real Time PCR .....	25
4.8	Etablierung des immunhistochemischen PRLr-Nachweises.....	25
4.9	Immunhistochemische Untersuchung .....	26
4.9.1	Durchführung der Immunhistochemie .....	26
4.9.2	Auswertung der Immunhistochemie .....	28

5	Resultate .....	29
5.1	Semi-quantitative Real Time PCR .....	29
5.2	Immunhistochemie .....	30
5.2.1	Nicht neoplastisches Gewebe .....	30
5.2.2	Mammaadenome .....	31
5.2.3	Mammaadenokarzinome .....	31
6	Diskussion .....	34
7	Referenzen .....	40
8	Danksagung .....	49
9	Lebenslauf .....	50
10	Anhang .....	51
10.1	Protokoll Hämalaun-Eosin-Färbung .....	51
10.2	Protokoll RNA-Extraktion RNeasy FFPE Kit .....	51
10.3	Patientengut .....	54

## **2 Zusammenfassung**

Mammatumoren gehören zu den häufigsten neoplastischen Erkrankungen der Hündin. Hohe Prolaktinserumspiegel scheinen die kanine Mammatumorgenese zu begünstigen; Daten zur proliferationsfördernden, antiapoptotischen, migratorischen und angiogenetischen Wirkung von Prolaktin stammen vor allem aus in vitro-Studien humaner Brustkrebszellen. Über die Expression des Prolaktinrezeptors, welcher die Wirkung von Prolaktin vermittelt, liegen in der Veterinärmedizin kaum Ergebnisse vor. Zur Untersuchung der Rolle des Prolaktins in der Pathogenese kaniner Mammatumoren wurde die Prolaktinrezeptorexpression in je zehn formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten Proben von nicht neoplastischem Gewebe, Adenomen und Adenokarzinomen mittels quantitativer Real Time PCR untersucht. Die höchste Expression wurde in normalem Mammagewebe ermittelt, in Adenomen und deutlicher noch in Adenokarzinomen war die Rezeptorexpression signifikant niedriger. Immunhistochemisch wurde die Expression des Prolaktinrezeptors ebenfalls in allen Gewebstypen, und dabei vorrangig in den epithelialen Zellen nachgewiesen. Die maligne Transformation des Gewebes spiegelte sich somit in einer Reduktion der Prolaktinrezeptorexpression wider. Diese Reduktion könnte Ausdruck eines Differenzierungsverlustes sein, ihre funktionelle Bedeutung ist unklar. Desweiteren stellt sich die Frage, inwieweit die Prolaktinwirkung an die Prolaktinrezeptorexpression gebunden ist. Diese Fragen sind Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

## Summary

Mammary tumors are among the most common neoplastic diseases of the female dog. High serum levels of Prolactin seem to promote tumorigenesis of canine mammary tumors; Data concerning the proliferative, anti-apoptotic, migratory and angiogenic effects of Prolactin have mainly been obtained by in-vitro-studies of human breast cancer cells. In veterinary medicine, little information is available about the expression of the prolactin receptor, which mediates the effects of Prolactin. To investigate the role of Prolactin in the pathogenesis of canine mammary tumors, Prolactin receptor expression was examined by quantitative real time PCR on 10 formalin-fixed, paraffin-embedded samples of canine normal mammary tissue, adenoma and adenocarcinoma, respectively. Highest expression levels were found in normal mammary tissue, while adenomas, and to an even higher degree adenocarcinomas, showed a significant decrease in Prolactin receptor expression. By immunohistochemistry, Prolactin receptor expression was demonstrated in each of the tissue types as well, predominantly in epithelial cells. Thus, malignant transformation of mammary tissue was associated with a decline in Prolactin receptor expression. This decline might represent a loss of differentiation, with its function not yet being understood. Furthermore, the effect of Prolactin might not necessarily be correlated with a high receptor expression rate. These questions have to be further investigated in future studies.



## **3 Einleitung**

### **3.1 Prolaktin und der Prolaktinrezeptor**

#### **3.1.1 Prolaktin**

Prolaktin ist ein Polypeptidhormon, das in den laktotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens gebildet wird. Zusätzlich wird es beim Menschen lokal im zentralen Nervensystem, im Immunsystem, im Uterus und vor allem auch in der Milchdrüse selbst produziert (31). Beim Menschen stellt ein 23 kDa-Protein die Hauptform des Prolaktins dar, jedoch existieren zudem zahlreiche Varianten, die durch alternatives Splicing, proteolytische Spaltung oder andere posttranslationale Modifikationen entstehen (31). Auch bei vielen anderen Spezies kommt Prolaktin in verschiedenen Isoformen vor, welche teilweise unterschiedlich biologische Aktivitäten haben. Bei der Hündin konnten vier verschiedene Isoformen mit unterschiedlichen Grössen isoliert werden. Das Vorhandensein dieser Isoformen war unabhängig vom Prolaktin-Blutspiegel und von möglicher Scheinträchtigkeit. Zu möglichen Unterschieden in den Aktivitäten der verschiedenen Isoformen beim Hund liegen bisher keine Angaben vor (36).

#### **3.1.2 Prolaktin-Wirkung**

Prolaktin entfaltet seine Wirkung nicht nur als endokrines Hormon, sondern auch über autokrine bzw. parakrine Mechanismen und ist auf diese Weise in den Regulationsfunktionen zahlreicher Organsysteme involviert (18). Am besten bekannt ist seine Wirkung auf die Milchdrüse: Prolaktin ist essenziell für das Wachstum und die Entwicklung der Mamma und bei den meisten Säugetierspezies auch für die Milchbildung und Aufrechterhaltung der Laktation (31). Dabei entfaltet Prolaktin seine Wirkung erst nach der Pubertät, indem es die lobuloalveoläre Entwicklung und Verzweigung der Milchgänge fördert (5,12). Bei der Hündin und einigen Nagerspezies ist Prolaktin zudem ein essentieller luteotropher Faktor in der zweiten Trächtigkeitshälfte und in die Ausprägung von maternalem Verhalten involviert (37,53,59,134). Auch bei männlichen Säugetieren ist Prolaktin an der Regulation der Reproduktionsfunktionen beteiligt, indem es die Wirkung des Luteinisierenden Hormons (LH) an den Leydigzellen verstärkt, die Androgenwirkung an den akzessorischen Geschlechtsdrüsen fördert und ebenfalls das Verhalten beeinflusst.

So korreliert bei nicht domestizierten Kaniden die Beteiligung der männlichen Tiere an der Brutpflege mit dem saisonalen Prolaktin-Peak (54). Eine Hyperprolaktinämie führt sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren zur Unterdrückung der Gonadenfunktion und damit zur Infertilität (44,54,110).

Neben seiner zentralen Bedeutung für die Reproduktion hat Prolaktin unzählige weitere Funktionen, so z.B. in der Regulation des Immunsystems, der osmotischen Balance, der Angiogenese, des Gewichts, der endokrinen Pankreasfunktion und des Verhaltens (5,31).

### **3.1.3 Regulation der Prolaktin-Freisetzung**

Bei Säugetieren wird die Steuerung der pulsatischen Prolaktinsekretion, wie bei anderen hypophysären Hormonen, durch den Hypothalamus kontrolliert. Der Hauptregelmechanismus ist dabei die Hemmung der Prolaktinfreisetzung durch Dopamin. Dopamin wird von sogenannten tuberoinfundibulären dopaminergen Neuronen (TIDA-Neuronen) des Hypothalamus gebildet und erreicht die lactotrophen Zellen über das Hypophysen-Pfortadersystem (31). Über einen negativen Feedback-Mechanismus wirkt Prolaktin stimulierend auf die TIDA-Neuronen und reguliert so seine Freisetzung selbst. Dieser Mechanismus ist während der späten Trächtigkeit und Laktation supprimiert, damit die für diese Reproduktionsphasen essenzielle Prolaktinausschüttung nicht gehemmt wird (43). Spezifische Prolaktin-Freisetzungs-faktoren scheint es hingegen nicht zu geben, vielmehr sind zahlreiche Substanzen an der Dopamin-Hemmung und somit an der Prolaktinfreisetzung beteiligt (5). Dazu gehören z.B. Thyreotropin-Releasing Hormone (55,63,132), aber auch das Prolactin-Releasing Peptide (71) und Opiode (57). Auch die gonadalen Steroidhormone spielen bei der Regulation der Prolaktinfreisetzung eine wichtige Rolle: Hohe Plasma-Östrogenspiegel fördern die Prolaktinsekretion. Dies geschieht wahrscheinlich über eine Desensibilisierung der Dopaminrezeptoren an den lactotrophen Zellen. Progesteron hingegen hat einen hemmenden Einfluss (58). Prolaktin selber beeinflusst wiederum die Regulation der Reproduktionsfunktionen: Hohe Serum-Prolaktinkonzentrationen unterdrücken die Freisetzung von Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) aus dem Hypothalamus, wodurch die Sekretion von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und Luteinisierendem Hormon (LH) gehemmt und damit die Gonadenfunktion supprimiert wird (2).

### **3.1.4 Prolaktin-Blutspiegel beim Hund**

Beim Hund und beim Wolf ist der Verlauf der Prolaktinsekretion saisonal. Sowohl intakte weibliche als auch männliche Tiere haben die höchsten Prolaktinspiegel im Frühsommer und die niedrigsten im Winter (60). Durch den Prolaktinabfall im Winter wird die hemmende Wirkung des Prolaktins auf die Gonadenfunktion aufgehoben, so dass die weiblichen Tiere in dieser Zeit läufig werden und deckbereit sind. Der Prolaktinanstieg und die Höchstwerte im Frühsommer treten dann zeitgleich mit der Laktation und Aufzucht des Wurfes auf (54). Ein circadianes Sekretionsmuster, wie es beim Menschen und bei vielen anderen Spezies vorkommt, konnte beim Hund nicht nachgewiesen werden (35).

Interessanterweise ist der Prolaktinspiegel beim Hund, wie auch bei Mäusen, rasseabhängig (21,111,130).

Die Prolaktinspiegel von Hündinnen sind in allen Zyklusphasen signifikant höher als die von Rüden (20). Detaillierte Studien über die Veränderungen der Prolaktinspiegel bei Hündinnen liegen nahezu ausschliesslich für die Zyklusphasen Proöstrus, Östrus und Metöstrus sowie während der Trächtigkeit und Laktation vor. Bei der Hündin steigt der Prolaktinspiegel ca. 4 Wochen nach der Ovulation sowohl bei trächtigen als auch bei nicht trächtigen Hündinnen stark an, wobei trächtige Hündinnen signifikant höhere Prolaktin-Blutspiegel aufweisen als nicht trächtige. Bei der trächtigen Hündin ist der Prolaktin-Blutspiegel um den Zeitpunkt der Geburt und zu Beginn der Laktation maximal und bleibt während der ersten Laktationswochen auf diesem hohen Niveau. Danach sinkt er stetig ab. Etwa 120 Tage nach der Geburt werden wieder anöstrische Prolaktinwerte erreicht. Der gleiche Hormonverlauf, wenn auch weniger ausgeprägt, zeigt sich bei der nicht graviden Hündin und ist für die physiologische Lactatio falsa verantwortlich (19,54,59). Angaben über den Verlauf der Prolaktinsekretion in der längsten Zyklusphase, dem Anöstrus, basieren nur auf einer geringen Tierzahl. Zudem weist die Erstellung eines 24-Stunden Prolaktin-Profils bei zehn intakten Mischlings-Hündinnen im Anöstrus auf eine starke interindividuelle und intraindividuelle Variabilität der Prolaktin-Konzentration hin, welche auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Tiere zurückgeführt wird (35). Über die Prolaktinspiegel bei kastrierten Hündinnen ist noch nichts bekannt. Beim Rüden scheint die Prolaktinkonzentration bei intakten und bei gonadektomierten Tieren gleich zu sein (45).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle in bisherigen Studien erhobenen Prolaktinwerte sehr stark schwanken, was zum Teil auf unterschiedliche Rassezugehörigkeiten der Probanden zurückzuführen sein könnte, hauptsächlich jedoch auf methodischen Differenzen beruht (35).

Die oben aufgeführten Gründe (Methodische Differenzen, Rasse-, Saison- und Zyklusabhängigkeit, starke inter- und intraindividuelle Schwankungen) machen einen Vergleich der Prolaktin-Blutspiegel verschiedener Tiere sehr schwierig und fehleranfällig.

### **3.1.5 Prolaktinrezeptor**

Entsprechend der unzähligen Wirkungen von Prolaktin werden Prolaktinrezeptoren (PRLr) praktisch ubiquitär exprimiert, sie konnten bisher unter anderem in Gehirn, Retina, Lymphozyten, Haut, Ovar, Uterus, Brustdrüse, Hodengewebe, Prostata, Nebenniere, Niere, Leber, Dünndarm, Chorioid-Plexus, Pankreas und Fettgewebe nachgewiesen werden (1,5,15,17,104).

Der Prolaktinrezeptor gehört zur Superfamilie der Zytokinrezeptoren (4). Diese Rezeptoren sind sogenannte non-tyrosine-kinase single-pass transmembranöse Proteine (32). Der Prolaktinrezeptor setzt sich aus drei Domänen zusammen: Einer extrazellulären Domäne, einer transmembranösen Domäne und einer intrazellulären Domäne (33). Die extrazelluläre Domäne ist für die Bindung des Liganden verantwortlich. Multiple Prolaktinrezeptor-Isoformen, welche durch alternatives Splicing entstehen, wurden identifiziert (5). Die meisten sind in ihrer extrazellulären Domäne identisch, unterscheiden sich aber in ihrem intrazellulären Anteil (5,16,32). Beim Menschen sind bisher sechs grosse Isoformen des Prolaktinrezeptors sowie eine siebte kürzere Form, welche ein proteolytisches Spaltprodukt darstellt, bekannt (16). Genauere Kenntnisse über den Prolaktinrezeptor beim Hund und über mögliche kanine Isoformen fehlen bisher vollständig.

Bekannt ist, dass Prolaktin seine Wirkung über die Bindung an seinen Rezeptor entfaltet. Die Signalkaskade zur Stimulierung der Zellproliferation im Mammaepithel, die durch die Bindung von Prolaktin an seinen Rezeptor in Gang gesetzt wird, besteht in der Aktivierung von Signalsystemen, zu denen vor allem Januskinasen (Jak, v.a. Jak2), Signal-Transduktions- und Transkriptions-Aktivator-Proteine (Stat-Proteine, v.a. Stat5a und Stat5b), Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), aber auch andere Zellmediatoren gehören (16).

## **3.2 Bedeutung von Prolaktin in der Brustkrebsentstehung beim Menschen**

### **3.2.1 Historische Perspektive**

Schon sehr lange ist bekannt, dass eine Hyperprolaktinämie bei der Maus und bei der Ratte die Karzinogenese von Mammatumoren induziert (139-141). So konnte beispielsweise bei Mäusen die Mammatumorinzidenz durch Hypophysen-Isografts, die grosse Mengen Prolaktin sezernieren, wie auch durch tägliche subkutane Injektionen von Prolaktin deutlich erhöht werden (9,10). Zudem wurde bei verschiedenen Rattenstämmen eine Korrelation zwischen Prolaktinspiegel und Ansprechen auf chemische Karzinogene festgestellt (11). Dies wurde bis vor kurzem als nagerspezifisches Phänomen interpretiert und eine Übertragbarkeit auf den Menschen und auf andere Spezies negiert. Als Begründung wurde angeführt, dass zentral wirkende Dopamin-Agonisten, welche die Prolaktinfreisetzung unterdrücken, in mehreren Studien keine positive Wirkung auf die Brustkrebsprogression bei betroffenen Frauen hatten (49). Ausserdem wurde die Tatsache, dass Prolaktin beim Nager, nicht aber beim Menschen, luteotroph wirkt, als Begründung für die speziesspezifische Wirkung des Hormons herangezogen: Es wurde postuliert, dass ein Synergismus von erhöhtem Prolaktinspiegel, Progesteron und Östrogen die Mammatumorentstehung beim Nager fördert. Diese Situation wurde als absolut nagerspezifisch angesehen (42). Die Erkenntnis, dass Prolaktin beim Menschen nicht nur im Hypophysenvorderlappen, sondern auch lokal in der Mamma gebildet wird und diese lokale Prolaktinbildung durch Dopamin-Agonisten nicht unterdrückt werden kann, entfachte das Interesse an der Bedeutung von Prolaktin für die Brustkrebsentstehung erneut (34,38,39). Prolaktin wurde in diesem Zusammenhang als «das vergessene Hormon beim menschlichen Brustkrebs» bezeichnet (136).

### **3.2.2 Neue Erkenntnisse**

In den letzten Jahren wurden mehrere humanepidemiologische und molekularbiologische Studien veröffentlicht, die klare Beweise dafür liefern, dass die pathophysiologische Wirkung von Prolaktin auf die Mammatumorentstehung und Progression kein speziesspezifisches Phänomen ist, sondern auf den Menschen übertragen werden kann (47,50). So fördert Prolaktin in der menschlichen Brustdrüse das Tumorwachstum sowohl in vitro als auch in vivo und ist an der Entwicklung von benignen und malignen Mammaläsionen beteiligt (47,49,50). Darüber hinaus scheint

Prolaktin beim Menschen auch bei der Entstehung von anderen Krebsarten des Reproduktionstraktes, wie Eierstocks- und Endometriumskarzinomen und wahrscheinlich auch bei Prostatakarzinomen massgeblich beteiligt zu sein (50,66).

#### *3.2.2.1 Epidemiologische Hinweise*

Grosse epidemiologische Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Dopamin-Antagonismus, Hyperprolaktinämie und Brustkrebs nachweisen (47,50). Die wichtigsten werden in der Folge kurz zusammengefasst. In einer retrospektiven Kohortenstudie mit über 100'000 Teilnehmerinnen war das Brustkrebsrisiko bei Frauen, die über längere Zeit mit Dopamin-Antagonisten behandelt wurden, um 16% erhöht. Dabei bestand eine dosisabhängige Beziehung zwischen kumulativer Dosis und Risikoerhöhung. Die Erhöhung des Brustkrebsrisikos durch die Langzeiteinnahme eines Dopamin-Antagonisten ist vergleichbar mit einer postmenopausalen Östrogen- und Progesteron-Hormonersatztherapie (50,138). Zwei prospektive Nested Case-Control-Studien mit jeweils über 30'000 Teilnehmerinnen, welche im Rahmen der Nurses' Health Study I und II durchgeführt wurden, untersuchten den Zusammenhang zwischen Prolaktin-Blutspiegel und Brustkrebsrisiko. Sowohl bei prämenopausalen als auch bei postmenopausalen Frauen waren der Prolaktin-Blutspiegel und das spätere Brustkrebsrisiko signifikant positiv korreliert. Dies galt insbesondere für Östrogen- und Progesteronrezeptor-positive Tumoren. Die Ergebnisse wurden durch eine weitere prospektive Studie aus dieser Gruppe, in der 851 postmenopausale Brustkrebsfälle mit 1275 gesunden Kontrollpatientinnen verglichen wurden, bestätigt (48,126,127,129). Interessanterweise war die Erhöhung des Brustkrebsrisikos unabhängig von der Blut-Östrogenkonzentration, was eine direkte hormonale Beteiligung von Prolaktin bei der Entstehung von Brustkrebs impliziert. Die Analyse der Brustkrebsfälle und Kontrollen in der Nurses' Health Study I und II ergibt, dass Prolaktin ein mittelstarker bis starker und wahrscheinlich unabhängiger Risikofaktor für Brustkrebs bei der Frau ist (127). Die Bedeutung von Prolaktin in der Mammatumorgenese wird auch aus den höheren Prolaktin-Blutspiegeln bei Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen und Probandinnen mit anderen Tumorarten ersichtlich. Dabei korrelieren höhere Prolaktin-Blutspiegel mit einer Verkürzung des krankheitsfreien Intervalls, mit einer Erhöhung der Inzidenz von Metastasen und einer Erhöhung der Mortalität (6,81,82). Selbst eine familiäre Vorbelastung mit Brustkrebs spiegelt sich bei gesunden prämenopausalen Frauen in höheren Prolaktin-Blutspiegeln wider (6).

Die Senkung der Prolaktin-Blutspiegel hingegen scheint zu einer erniedrigten Inzidenz von Brustkrebs zu führen. So haben primi- oder multipare Frauen dauerhaft niedrigere prä- und postmenopausale Blutspiegel im Vergleich zu nulliparen Frauen und zeitgleich auch ein erniedrigtes Mammatumorrisiko (18,27,128).

### *3.2.2.2 Molekular- und zellbiologische Hinweise*

Die Signalkaskadewege, die durch die Bindung von Prolaktin an seinen Rezeptor ausgelöst werden, sind an Schlüsselereignissen in der neoplastischen Progression (Proliferation, Survival, Invasion) und in der Resistenzbildung gegenüber heutigen Brustkrebstherapien beteiligt (14,52,65,73). Unabhängig von Östrogen stimuliert Prolaktin in menschlichen Brustkrebszellen die Proliferation, hemmt die Apoptose, erhöht die Zellmotilität und unterstützt die Tumervaskularisation (16,72,95,115). Prolaktin scheint also die gleichen Effekte sowohl auf humanes als auch auf nagerspezifisches Mammagewebe auszuüben und eine Tumorpromotorrolle zu erfüllen (49,50). Aber nicht alle durch Prolaktin ausgelösten Effekte passen zu dieser Rolle: So wird Prolaktin auch als Hemmer der Invasivität von Brustkrebszellen beschrieben, weil es die Zelldifferenzierung von Brustkrebszellen aufrechterhält (87,116,117). Die Blockierung des Prolaktin-Signaling führt zur Aktivierung von wichtigen prometastatischen Signalwegen, und in aggressiven Brustkrebszellen scheint die Prolaktinrezeptorexpression verlorenzugehen (3,87). Prolaktin scheint also eine duale Rolle bei der Brustkrebsentstehung und –progression zu haben: Einerseits eine proonkogene Wirkung in der Tumorinitiation, andererseits Aufrechterhaltung der Differenzierung und Unterdrückung der Invasivität bei fortgeschrittener Erkrankung (28,87,137). Dabei bestehen die Wirkungen von Prolaktin unabhängig vom Bildungsort (Hypophyse oder autokrine/parakrine Bildung im Mammagewebe selbst (16,40,128,135,136), wobei die extrahypophysäre Prolaktinsynthese von Tumorzellen nicht der zentralen Dopaminkontrolle unterliegt (6,34,38,39).

Die Sensitivität von Brustkrebszellen für Östrogen wird durch Prolaktin gesteigert. Östrogen wiederum erhöht die Transkription von Prolaktin in Brustkrebszellen und verstärkt so dessen autokrine/parakrine Wirkung (14,118). Wahrscheinlich ist für die Wirkung von Prolaktin in der menschlichen Mamma das Vorhandensein von Östrogen- oder Progesteronrezeptoren essenziell, und Prolaktin entfaltet einen Teil seiner Wirkung über den Östrogenrezeptor (41,126). Interessanterweise wurde gezeigt, dass Tamoxifen, ein Östrogenrezeptor-Blocker, an den Prolaktinrezeptor

bindet und ihn blockiert, was eine Kreuzreaktion zwischen Östrogen und dem Prolaktinrezeptor impliziert (135). Damit könnte ein Teil der Wirkung von Tamoxifen in der Brustkrebsbehandlung über den Prolaktinrezeptor erfolgen (50).

In Bezug auf die Prolaktinrezeptorexpression in menschlichen Brustkrebszellen liegen widersprüchliche Ergebnisse vor, was wahrscheinlich zumindest teilweise auf Unterschiede in den Nachweismethoden zurückzuführen ist (32). In älteren Studien ergab der Nachweis mittels Radioimmunoassay (RIA) bei 20-60% der humanen Mammatumoren eine Prolaktinrezeptorexpression (23,51,98,125), dagegen wurde mittels der später etablierten PCR und In-Situ-Hybridisierung eine Prolaktinrezeptorexpression bei 95-100% der Mammakarzinome und bei 93-100% der normalen Gewebeproben festgestellt (90,122). Während einige Forschungsgruppen beobachteten, dass maligne Brusttumoren verglichen mit normalem Gewebe verstärkt Prolaktinrezeptoren exprimieren (30,103,122), dokumentierten andere eine vergleichbare oder geringere Expression (17,75). In Zellkulturstudien war die Prolaktinrezeptorexpression je nach Zelllinie gegenüber normalen Brustepithelzellen erhöht, vermindert oder unverändert (90,93). Wenige Untersuchungen belegen einen Unterschied in der Lokalisation des Prolaktinrezeptors: So exprimierten maligne entartete Zellen den Prolaktinrezeptor vor allem im Zytoplasma, während die Expression in gesundem menschlichem Mammagewebe hauptsächlich auf das luminale Plasmalemm der Epithelzellen beschränkt war. Bei gutartigen Brustveränderungen variierte die Expression zwischen luminal, zytoplasmatisch oder einer Kombination beider Orte (30,33). Ob Prolaktinrezeptoren und Östrogen- und Progesteronrezeptoren koexprimiert werden, ist nach wie vor unklar (8,17,30,33,90,103).

Veränderungen im Prolaktin-induzierten zellinternen Signaling im Allgemeinen und in der Regulation der Prolaktinrezeptorexpression im Besonderen werden als äusserst wichtig für die Tumorentwicklung und –progression erachtet (73,74,96). Vor allem Prolaktin-aktiviertes Stat5a spielt eine essenzielle Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose. In menschlichem Brustkrebs ist ein Verlust von Stat5a-Signaling assoziiert mit einem undifferenzierten Tumortyp und einer schlechten Prognose (73,123). Das Prolaktin-induzierte Signaling wird auch durch einen verminderten Abbau des Prolaktinrezeptors verändert: Während in gesundem Gewebe durch Prolaktinfreisetzung ein Feedback-Mechanismus ausgelöst wird, welcher zur Downregulation des Rezeptors führt, kommt es bei Tumorzellen zu einer



Stabilisierung und Akkumulation von Prolaktinrezeptoren und somit zu einer permanenten Prolaktinwirkung auf das Gewebe (67,96). Mammaepithelzellen mit stabilisierten Prolaktinrezeptoren zeigen eine beschleunigte Proliferation und ein verstärktes invasives Wachstum (96). Hingegen hat eine Abnahme der Prolaktinrezeptorexpression in menschlichen Brustkrebszellen eine dramatische Reduktion der tumorigenen Eigenschaften dieser Zellen zur Folge (96). Bei Frauen, die unter multiplen Mamma-Fibroadenomen leiden, wurden zwei verschiedene mutierte Varianten des Prolaktinrezeptors identifiziert, welche beide konstitutiv aktiv sind, d.h. sie lösen, unabhängig von einer Prolaktinbindung, dauernd die downstream liegenden Signalwege aus, wodurch eine anti-apoptotische und proliferative Wirkung erzielt wird (7,22).

### **3.3 Mammatumoren beim weiblichen Hund**

Bei der Hündin treten Mammatumoren dreimal so häufig auf wie bei der Frau, sie sind eine der häufigsten neoplastischen Erkrankungen des weiblichen Hundes (112). Etwa die Hälfte der kaninen Mammatumore ist maligne, mit einer mittleren Überlebenszeit von lediglich 4 bis 17 Monaten (13,78). Die Inzidenz nimmt mit dem Alter zu: Das mittlere Alter bei Tumormanifestation beträgt 10 bis 11 Jahre (25,109). Die Entwicklung kaniner Mammatumore unterliegt einer Reihe von Einflüssen, wovon der hormonale der unbestrittenste und sicherlich der wichtigste ist. Die Rolle der Sexualsteroiden Östrogen und Progesteron in der Pathogenese der kaninen Mammatumore ist gut untersucht (106). So beträgt das Risiko einer kastrierten Hündin, in ihrer Lebenszeit einen Mammatumor zu entwickeln, verglichen mit dem Risiko einer intakten Hündin 0,5%, 8% oder 26%, abhängig davon, ob die Kastration vor der ersten Läufigkeit, nach der ersten Läufigkeit oder nach der zweiten Läufigkeit durchgeführt wurde (109,120). Die Inzidenz von Mammatumoren ist somit in Gebieten, in denen die Frühkastration routinemässig durchgeführt wird, deutlich niedriger als in anderen (94,112).

Die Tatsache, dass eine frühe Kastration vor Mammatumoren schützt, wird heute allein auf die mitogene Wirkung der Ovarsteroiden – vor allem von Progesteron – auf Mammazellen zurückgeführt (112). Auch exogene Gestagene, wie sie zur Läufigkeitsunterdrückung Anwendung finden, erhöhen die Inzidenz von Mammatumoren beim Hund (64). Im Gegensatz zu früheren Studien, die als Folge einer Gestagenexposition entweder nur eine geringgradige Risikoerhöhung oder eine

Risikoerhöhung nur für benigne Tumoren feststellen konnten (77), waren in einer neueren Studie (114) bei 91% der mit Gestagenen behandelten Hündinnen die aufgetretenen Tumoren maligne. Der tumorfördernde Effekt von Gestagenen beruht neben der mitogenen Wirkung auch auf einer Erhöhung der Produktion von Wachstumshormon im Milchdrüsengewebe. Wachstumshormon wirkt einerseits direkt wachstumsfördernd auf das Mammagewebe, hat aber andererseits auch einen indirekten Effekt über insulin-like growth factor 1 (IGF-1), welcher essentielle Funktionen sowohl bei der normalen Zellproliferation als auch bei malignen Prozessen ausübt. Maligne Mammatumoren der Hündin weisen in verschiedenen Studien in 50 bis 88% der Fälle Östrogen- und Progesteronrezeptoren auf (68,85). Mit steigender Malignität des Tumors sinkt der Rezeptorgehalt (76). So wirken Steroidhormone offenbar während der frühen Stadien der Karzinogenese auf ihre Zielzellen, scheinen dann aber ihre stimulatorische Wirkung zu verlieren (94). Daneben spielen auch andere Wachstumsfaktoren wie der epidermal growth factor (EGF) und transforming growth factors (TGFs) bei der Tumorentstehung eine Rolle (84,106).

Eine Verminderung des Mammatumorrisikos durch eine Trächtigkeit, wie sie beim Menschen durch eine Schwangerschaft nachgewiesen ist, konnte bis jetzt beim Hund nicht eindeutig gezeigt werden (109,120). Hingegen spielt eine familiäre Vorbelastung wohl auch beim Hund eine wichtige Rolle (80). Bei einigen Hunderassen scheint eine Prädisposition für die Entwicklung von Mammatumoren zu bestehen, so zum Beispiel beim Boxer, Cocker Spaniel, English Springer Spaniel und Dackel (79).

### **3.4 Bedeutung von Prolaktin in der Mammatumorentstehung beim Hund**

Spontan auftretende Mammatumoren ähneln in ihrem molekularbiologischen Verhalten und in ihrer Reaktion auf zytotoxische Substanzen sehr stark den humanen Mammatumoren, auch wenn sich die Häufigkeit der einzelnen histologischen Subtypen stark unterscheidet. Aus diesem Grund werden kanine Mammatumoren oft als biologisches Modell für die Brustkrebserkrankung der Frau herangezogen (61,62,84,86,88,89,91,92,105,131).

Über die Rolle von Prolaktin bei der Mammatumorentstehung und Progression bei der Hündin ist zum heutigen Zeitpunkt noch sehr wenig bekannt. Sporadische

Publikationen lassen eine Tumorpromotorrolle vermuten (26,46), und Prolaktinrezeptoren konnten in kaninen Mammatumorzellen in vivo und in vitro nachgewiesen werden (108,133). Die Prolaktinspiegel sowohl im Serum als auch in Gewebshomogenaten waren bei Hündinnen mit benignen und malignen Mammatumoren erhöht (97). Allerdings sind die vorliegenden Daten unvollständig, widersprüchlich und teilweise mit veralteten Methoden gewonnen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, unser derzeitiges Wissen über den Einfluss von Prolaktin auf die Entstehung von kaninen Mammatumoren zu erweitern. Zu diesem Zweck sollte der Prolaktinrezeptorstatus bei der Hündin in gesundem Mammagewebe sowie in benignen und malignen Mammatumoren mittels semi-quantitativer Real Time (TaqMan) PCR und Immunhistochemie evaluiert werden. Dazu mussten beide Verfahren zuerst für den kaninen Prolaktinrezeptor etabliert werden.

## **4 Material und Methoden**

### **4.1 Untersuchungsgut**

Für die Untersuchung stand formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe sowie nicht neoplastisches Gewebe zur Verfügung, das von der Abteilung für Kleintierfortpflanzung der Vetsuisse-Fakultät Zürich zur Diagnostik an das Institut für Veterinärpathologie der Vetsuisse-Fakultät Zürich gesandt wurde. Das Untersuchungsmaterial stammte von 25 intakten Hündinnen unterschiedlicher Rassen, die aufgrund von Umfangsvermehrungen der Mamma operiert wurden. Das Alter der Hündinnen zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen fünf und 13 Jahren.

### **4.2 Gewinnung und Fixation des Gewebematerials**

Im Vorfeld der Dissertation wurde zum Zeitpunkt der klinischen Behandlung in Abhängigkeit von der Ausbreitung der Tumorerkrankung entweder eine regionale oder eine radikale Mastektomie durchgeführt. Im Rahmen der histopathologischen Diagnostik wurde das Gewebe nach einer Fixationsdauer von 24 bis maximal 72 Stunden in gepuffertem 10%igem Formalin nach Routinemethoden in Paraffin eingebettet. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte am Rotationsmikrotom (HM 355 S, Microm AG, Schweiz), die Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung unter Verwendung eines Färbeautomaten (Tissue Stainer COT 20, Medite Medizintechnik, Deutschland). Die Schnitte wurden maschinell eingedeckt (Coveraid, Bayer AG, Schweiz). Diese vorbestehenden Schnitte wurden für die Selektion der Proben für diese Untersuchung verwendet.

### **4.3 Auswahl der Proben**

Für die Untersuchung wurden jeweils zehn Proben von nicht-neoplastischem Mammagewebe, Adenomgewebe und Adenokarzinomgewebe aus dem Paraffinmaterial der 25 Hunde ausgewählt. Die Auswahl der Proben basierte auf der Verfügbarkeit, dem Erhaltungszustand des eingebetteten Gewebes sowie der histopathologischen Diagnose.

#### **4.4 Anfertigung der Stanzbiopsien**

Für die RNA-Extraktion und für die immunhistochemische Untersuchung wurden aus den archivierten Paraffinblöcken an aufgrund des histologischen Bildes ausgewählten Stellen Stanzen mit einem Durchmesser von 2,0 mm manuell entnommen (Tissue MicroArray Builder, cat no. 20010.2, punch-extractor „pen“, Histopathology Ltd, H-7608 Pécs). Pro Gewebeprobe wurden zwei Stanzen entnommen. Dabei wurde beachtet, dass jeweils ausschliesslich der gewünschte Gewebetyp entnommen wurde. Die beiden Stanzen wurden nebeneinander in einem neuen Paraffinblock eingeschlossen und für die folgenden Untersuchungen verwendet.

#### **4.5 Anfertigung der Gewebeschnitte für die Untersuchungen**

Von den so angefertigten Paraffinblöcken wurden auf einem Rotationsmikrotom (RM 2165, Leica, Deutschland) in der angegebenen Reihenfolge folgende Schnitte für die Untersuchungen angefertigt:

1. 3 µm-Schnitt für HE-Färbung
2. 20 x 10 µm-Schnitt für RNA-Extraktion
3. 3 x 3 µm-Schnitt für Immunhistochemie
4. 3 µm-Schnitt für HE-Färbung

Die unter Punkt 1. und 4. aufgeführten Schnitte dienten zur Kontrolle, dass in allen Präparaten der gewünschte Gewebetyp ausschliesslich und in ausreichender Menge vorhanden war.

#### **4.6 Färbung der Schnittpräparate für die lichtmikroskopische Untersuchung**

Für die HE-Färbung (siehe Kapitel 10.1) wurden die Schnitte zunächst in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100%, 96%, 80%) rehydriert. Daraufhin erfolgte eine Spülung mit destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden nun für fünf Minuten in Hämatoxylinlösung gefärbt und anschliessend wieder in Aqua dest. gewaschen. Nach einer Gegenfärbung mit Eosin über fünf Minuten und einer erneuten Spülung mit destilliertem Wasser wurden im Anschluss die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 80%, 100%) dehydriert. Zuletzt wurden die Schnitte maschinell eingedeckt (Promounter, Medite Medizintechnik, Schweiz).

## 4.7 Durchführung der semi-quantitativen Real Time PCR

### 4.7.1 RNA-Extraktion

Von jedem Paraffinblock wurden jeweils 20 Schnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt. Überschüssiges Paraffin wurde auf dem Wasserbad mit Nadeln manuell so weit wie möglich entfernt. Alle Schnitte eines Blockes wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäss (Eppendorf, Deutschland) gegeben. Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Schweiz) gemäss Herstelleranweisung durchgeführt.

### 4.7.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde UV-spektralphotometrisch mit dem SmartSpec-Gerät (BioRad, Schweiz) bestimmt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 4.7.3 DNase-Behandlung

Um eine Amplifikation von eventuell noch in der Probenlösung vorhandener genomischer DNA und somit ein falsch positives Ergebnis zu vermeiden, wurde vor der RT-PCR eine DNase-Behandlung durchgeführt. Die Herstellung der Ansätze für die DNase-Behandlung erfolgte auf Eis in 0.2 ml-Eppendorfgefässen (Zusammensetzung siehe Tabelle 1). Zu 3.25 µl des DNase-Mixes wurden 6.65 µl RNA-Lösung (200 ng/µl) gegeben, um ein Endvolumen von 9.90 µl zu erhalten. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Eine RT-Minus-Kontrolle wurde durchgeführt, um den Erfolg der DNase-Behandlung zu bestätigen.

Tabelle 1: Zusammensetzung des DNase-Mixes zur DNase-Behandlung der Proben vor der RT-PCR

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stamm-lösung	Hersteller
DNase-Puffer	2	5x	Applied Biosystems, USA
DNase I RNase frei	1	10 U/µl	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
RNase-Inhibitor	0.25	40 U/µl	MBI Fermentas, Deutschland
Gesamtvolumen	3.25		

Die DNase-Behandlung wurde im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Deutschland), mit folgenden Reaktionsschritten durchgeführt:

- Phase a) 10 Minuten 37° C
- Phase b) 5 Minuten 75° C
- Phase c) abkühlen auf 4° C

#### 4.7.4 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurden die Reagenzien aus dem Gold RNA PCR Core Kit (Applied Biosystems, USA) verwendet. Als Startprimer wurden unspezifisch bindende Primer (Random Hexamers) eingesetzt. Pro Ansatz wurde 1,5 µl DNase behandelte RNA-Lösung, entsprechend 200 ng/µl der Gesamt-RNA, den 8,5 µl des RT-Mastermixes zugegeben. Die zu jedem Ansatz pipettierten Reagenzien sind in Tab. 2 aufgeführt.

*Tabelle 2: Zusammensetzung der Reagenzien für die Reverse Transkription*

Komponenten	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
Nuclease free Water	1	
RT Buffer	2	5x
MgCl <sub>2</sub>	2	25 mM
dNTPs	2	10 mM
Random hexamers	0.5	50 µM
RNAse Inhibitor	0.5	50 U/µl
Reverse Transcriptase AMV-RT	0.5	10 U/µl

Die cDNA-Synthese wurde ebenfalls im Thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Deutschland) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 8 Minuten bei 21°C
- 15 Minuten bei 42°C
- 5 Minuten bei 99°C
- 5 Minuten bei 5°C
- Aufbewahrung der Proben im Thermocycler bis zur Entnahme nach Absenkung der Temperatur auf 4°C

Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### 4.7.5 Quantitative Real Time (TaqMan) PCR

Für die Durchführung der Real Time PCR wurde der Taqman Master Mix (FastStart Universal Probe Master, Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) eingesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tab. 3 dargestellt. Zu 20 µl Reaktionsansatz wurden 5 µl cDNA-Lösung pipettiert. Diese Untersuchung wurde für jede Probe im Doppel durchgeführt. Um eine Kontamination auszuschliessen, wurde bei jedem Ansatz eine No-Template-Kontrolle durchgeführt.

Die quantitative Real Time PCR zur Bestimmung der Expression des Prolaktinrezeptors und des Housekeeping-Gens GAPDH erfolgte mittels des TaqMan-Sonden-Verfahrens. Die Effizienz der quantitativen Real Time PCR wurde mit der C<sub>T</sub>-Slope-Methode anhand einer zehnfachen Verdünnungsreihe der PCR-Produkte gemäss Herstelleranweisung bestimmt (ABI PRISM™ 7000 Sequence Detector, Applied Biosystems, USA).

*Tabelle 3: Reaktionsansatz für die quantitative Real Time PCR*

Komponente	Einfacher Ansatz (µl)	Stammlösung
2 x uMM Buffer	12.5	2x
Sense-Primer	1.5	5 µM
Antisense-Primer	1.5	5 µM
TaqMan-Sonde	1	5 µM
Template	5	
Autoklaviertes Wasser	3.5	

In Tab. 4 sind die Basensequenzen der verwendeten Primer und TaqMan-Sonden dargestellt. Die Auswahl erfolgte mit Hilfe der Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, USA). Die Primer und TaqMan-Sonden wurden von der Firma Eurogentec (Belgien) hergestellt.



Tabelle 4: Für die Real Time PCR verwendete Primer und Sonden

Primer	Ursprungssequenz (Genbank Accession-Nr)	Basen- sequenzen	Länge des Amplifikates
GAPDH-for	AB028142	GCT GCC AAA TAT GAC GAC ATC A	75 Basenpaare
GAPDH-rev		GTA GCC CAG GAT GCC TTT GAG	
GAPDH TaqMan-Sonde		TCC CTC CGA TGC CTG CTT CAC TAC CTT	
PRLr-for	HQ267784 (GenBank, under revision)	GGA TCT TTG TGG CCG TTC TTT	92 Basenpaare
PRLr-rev		AAG GAT GCA GGT CAC CAT GCT AT	
PRLr- Taqman-Sonde		ATT ATG GTC GTA GCA GTG GCT TTG AAA GGC	

Die Real Time PCR Reaktionen wurden in einem automatischen Fluorometer (7500 Fast-Real-Time PCR System, Applied Biosystems, USA) unter Verwendung von qPCR 96-well-plates (Eurogentec, Belgien) durchgeführt.

Die Amplifikation wurde bei folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Programmschritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	1	95°C	10 Minuten
Denaturierung	40	95°C	15 Sekunden
Annealing und Verlängerung		60°C	1 Minute

#### 4.7.6 Quantifizierung der Real Time PCR

Zur Quantifizierung der in der Real Time PCR ermittelten Genexpression kann eine absolute oder eine relative Quantifizierung herangezogen werden. Die absolute Quantifizierung gibt die Kopienzahl eines Gens an, also eine absolute Menge. Diese

Methode erfordert einen exakten Standard, z.B. eine definierte Menge an Plasmid-DNA des entsprechenden Gens, zur Erstellung einer Regressionsgeraden.

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens in Bezug auf ein Referenzgen untersucht. Dieses Housekeeping-Gen, das als Referenzgen eingesetzt wird, sollte deshalb möglichst konstant in verschiedenen Geweben und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen exprimiert werden. Ausserdem müssen das Zielgen und das Referenzgen vergleichbare Reaktionseffizienzen aufweisen.

In der vorliegenden Studie wurde das Housekeeping-Gen GAPDH als Referenzgen verwendet.

Für die Quantifizierung wird der Fluoreszenz-Schwellenwert, der so genannte Threshold Cycle oder  $C_T$ -Wert als Grundlage verwendet. Der  $C_T$ -Wert bezeichnet den PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal einen signifikant höheren Wert annimmt als die Hintergrundfluoreszenz. Zu Beginn der PCR-Reaktion wird nur die Hintergrundfluoreszenz bestimmt, da aufgrund der geringen Template-Konzentration während der ersten Zyklen in der Regel noch keine Fluoreszenz messbar ist. Der  $C_T$ -Wert gibt also den Zeitpunkt an, ab dem eine exponentielle Amplifikation stattfindet und die Synthese von Doppelstrang-cDNA nicht durch limitierende Faktoren wie z.B. Primer- oder Nukleotidmangel beeinflusst wird.

Der  $C_T$ -Wert ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der ursprünglich eingesetzten cDNA-Kopienzahl des entsprechenden Gens, je mehr cDNA-Template also anfangs vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind erforderlich, bis das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

Für die Bestimmung der relativen Genexpression werden drei Formeln verwendet:

Zuerst wird der Unterschied an Thresholdzyklen zwischen Zielgen und Referenzgen berechnet. Als Referenzgen wird GAPDH verwendet.

$$\Delta C_T = \Delta C_{T\text{Zielgen}} - \Delta C_{T\text{GAPDH}}$$

Vor der Bestimmung der relativen Genexpression muss noch  $\Delta\Delta C_T$  bestimmt werden. Dafür wird ein Kalibrator ausgewählt, d.h. die Probe, bei der die Expression am niedrigsten war und die somit den höchsten  $\Delta C_T$ -Wert hatte.

Der  $\Delta C_T$ -Wert des Kalibrators wird von den  $\Delta C_T$ -Werten aller Proben abgezogen:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{Zielgen}} - \Delta C_{T\text{Kalibrator}}$$

Mit Hilfe des  $\Delta\Delta C_T$  kann die relative Genexpression berechnet werden:

$$RGE = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$$

Die RGE gibt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zur Probe mit der geringsten Expression (Kalibrator) an.

#### **4.7.7 Statistische Auswertung der Real Time PCR**

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Software-Programms GraphPad3 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) durchgeführt. Es wurde ein ungepaarter t-Test zum Vergleich zwischen Normalgewebe und Adenomgewebe, Normalgewebe und Adenokarzinomgewebe sowie Adenomgewebe und Adenokarzinomgewebe angewendet. Die Signifikanzgrenze wurde auf  $p < 0.05$  gesetzt.

### **4.8 Etablierung des immunhistochemischen PRLr-Nachweises**

Da bisher kein hundespezifischer PRLr-Antikörper bekannt ist, wurden zur Etablierung des PRLr-Nachweises ein polyklonaler und drei kommerziell erhältliche monoklonale PRLr-Antikörper (Tab. 5) getestet. Dazu wurde ein Tissue Array aus 2 mm-Stanzen formalinfixierten Gewebes aus dem Archiv des Instituts für Veterinärpathologie der Vetsuisse-Fakultät Zürich von vier kaninen Mammaadenomen, vier kaninen Mammaadenokarzinomen und sechs nicht neoplastischen kaninen Mammagewebsproben sowie einer Probe von kaninem Hypophysengewebe (Positivkontrolle) zusammengesetzt. Diese Gewebeproben stammten nicht von Hunden, deren Mammagewebe für die vorliegende Untersuchung verwendet wurde. Die Antikörper wurden an Schnitten aus diesem Array getestet.

Das Austesten von Antikörpern für die Immunhistochemie erfolgte mittels der Standard-Immunperoxidase-Methode mit einem Detektions-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers (EnVision Detection Systems, Dako, Dänemark).

### Palette von Schnittvorbehandlungen (Antigen Retrieval):

- Keine Vorbehandlung
- Protease 10 min
- Hitze 98 °C in Zitratpuffer (sauer) 20 min
- Hitze 98 °C in EDTA-Puffer (basisch) 20 min
- Hitze und Druck 125 °C in Zitratpuffer 3 min
- Hitze und Druck 125 °C in EDTA-Puffer 3 min.

Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte mit verschiedenen Verdünnungen (zuerst gemäss den Angaben des Herstellers, weitere nach Bedarf) unter verschiedenen Bedingungen (Lagerung über Nacht bei 4 °C und eine Stunde bei Raumtemperatur).

Tabelle 5: Für den PRLr-Nachweis ausgetestete Antikörper

Antikörper (AK)	Kreuzreagierende Spezies gemäss Hersteller	Hersteller	Katalog-Nr.
Polyklonale AK			
H-300	Mensch, Maus, Ratte	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-20992
Monoklonale AK			
Anti-human PRLr AK	Mensch	R&D Systems, USA	AF 1167
B 6.2	Mensch	Acris, Deutschland	AM00543PU-N
U5	Mensch, Kaninchen, Ratte, Schwein	Acris, Deutschland	SM5033P

## 4.9 Immunhistochemische Untersuchung

### 4.9.1 Durchführung der Immunhistochemie

Die Expression des PRLr wurde immunhistochemisch nach einem Protokoll von Kowalewski (2006) an paraffineingebetteten Proben untersucht. Für die Auswahl des Antikörpers zur Immunhistochemie wurden die verschiedenen ausgetesteten Antikörper im Hinblick auf eine gute Anfärbung des Mammagewebes bei gleichzeitig möglichst gering ausgeprägter Hintergrundfärbung verglichen. Diese Anforderungen wurden unter Verwendung des Anti-human Prolactin Receptor Antibody (R&D

Systems, USA) sehr gut erfüllt, da sich eine spezifische Markierung des Mammagewebes zeigte, während im Bindegewebsstroma kaum Signale auftraten. Der Antikörper U5 erbrachte ähnliche Resultate, jedoch konnte nicht in allen Proben des Arrays eine Markierung des Mammagewebes von gleich guter Qualität verzeichnet werden. Die anderen beiden Antikörper waren für die immunhistochemische Untersuchung nicht geeignet, da der polyklonale Antikörper H-300 nur sehr unspezifische Markierungen erzielte, und der Antikörper B 6.2 weder im Mammagewebe noch im Bindegewebsstroma zu Signalen führte. Somit wurde der Anti-human Prolactin Receptor Antibody (R&D Systems, USA) für die Untersuchung verwendet.

Am Rotationsmikrotom (Leica, Deutschland) wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperFrost-Plus Objektträger (Menzel Glaeser, Braunschweig) gezogen. Die Schnitte wurden anschliessend 2 x 10 Minuten in Xylol eingelegt und daraufhin in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert (jeweils 2 x 2 Minuten in 100%-, 96%- und 70%-igem Ethanol). Danach wurden die Objektträger für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 5 Minuten in Zitratpuffer inkubiert und anschliessend für 3 x 5 Minuten in vorgeheiztem Zitratpuffer in der Mikrowelle bei ca. 100°C gekocht. Während des Kochens verdampfte Flüssigkeit wurde durch destilliertes Wasser ersetzt. Zum Abkühlen wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 20 Minuten im Zitratpuffer belassen und danach während 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 0.3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol. Anschliessend wurden die Schnitte für 5 Minuten mit IHC-Puffer/Triton X-100 0.3% (12 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 2 g KCl + 80 g NaCl; pH 7,2 – 7,4) gewaschen. Die Objektträger wurden nun auf Coverplates (Shandon Coverplate, Thermo Scientific, USA) verbracht, um eine langsame, gleichmässige Überschichtung mit Blockierungslösung und dem Antikörper herbeizuführen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte für 20 Minuten mit 10%igem Pferdeserum in IHC-Puffer überschichtet. Nach Entfernung der Blockierungslösung wurden die Schnitte mit dem monoklonalen anti-PRLr-Primärantikörper, der hierfür 1:50 mit IHC-Puffer verdünnt wurde, überschichtet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, die ohne den Antikörper inkubiert wurden, sowie

Schnitte, die mit einer entsprechenden Isotypenkontrolle (Goat IgG, Kat I-5000, Vector Laboratories, USA) behandelt wurden.

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Objektträger 2 x 5 Minuten mit IHC-Puffer gespült und anschließend für 60 Minuten mit dem Sekundärantikörper (Biotinylated horse anti-goat IgG, Vector Laboratories, USA) in 1:100-Verdünnung bei Raumtemperatur überschichtet. Danach erfolgte eine fünfminütige Spülung der Präparate in IHC-Puffer und anschliessend eine 30minütige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppeltem Avidin-Biotin-Komplex aus dem ABC Reagent Kit (Vector Laboratories, USA) gemäss Herstelleranleitung.

Danach wurden die Schnitte 5 Minuten lang mit IHC-Puffer gewaschen und zur Darstellung des an den Sekundärantikörper gebundenen Avidin-Biotin-Komplexes für ca. eine Minute mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Dako, Dänemark) inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch zehnminütiges Spülen in fliessendem Leitungswasser gestoppt. Anschliessend wurden die Schnitte zur Gegenfärbung dreimal in Hämalun eingetaucht und fünf Minuten lang mit fliessendem Leitungswasser gewaschen. Schliesslich erfolgte eine Dehydrierung der Präparate durch eine ansteigende Alkoholreihe (kurzes Einlegen in 70% Ethanol, jeweils 2 x 2 min in 96% und 100% Ethanol); danach wurden sie 2 x 5 Minuten in Xylol inkubiert. Die Schnitte wurden maschinell eingedeckt (Promounter, Medite Medizintechnik, Schweiz).

#### **4.9.2 Auswertung der Immunhistochemie**

Die Auswertung der Präparate erfolgte lichtmikroskopisch bei 200- und 400-facher Vergrößerung. Zur Differenzierung von unspezifischen bzw. falsch-positiven Färbereaktionen wurden die Negativkontrollen verwendet. Die Auswertung der PRLr-Expression erfolgte deskriptiv.

## 5 Resultate

### 5.1 Semi-quantitative Real Time PCR

Mittels der semi-quantitativen Real Time PCR wurde die höchste Expression des PRLr in nicht neoplastischem Mammagewebe nachgewiesen. In den Adenomen war die Expression im Vergleich zum nicht neoplastischen Gewebe signifikant reduziert ( $p=0.0261$ ), und auch bei den Karzinomen zeigte sich eine signifikante Reduktion verglichen mit dem unveränderten Gewebe ( $p=0.008$ ). Gemessen an den Adenomen wiesen die Adenokarzinome ebenfalls eine signifikante Reduktion auf ( $p=0.0165$ ).

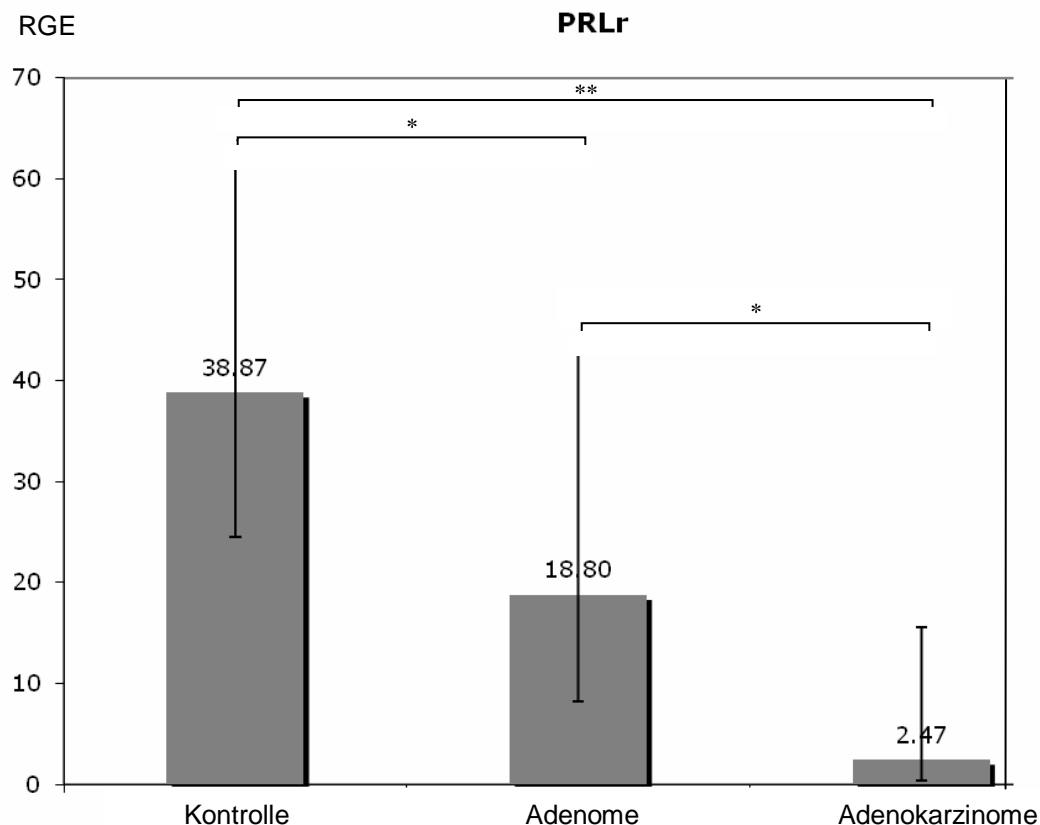


Abb. 1 : Expression des PRLr in nicht neoplastischem Mammagewebe (Kontrolle), Adenomen und Adenokarzinomen, gemessen mit semi-quantitativer Real Time PCR; angegeben sind die mittels der Real Time PCR ermittelten relativen Genexpressionen (RGE = relative gene expression) als geometrischer Mittelwert und Streufaktor [X g (SF)].

Insgesamt war die Expression in den Adenomen um das 2,4-fache und in den Adenokarzinomen um das 4,8-fache herabgesetzt, verglichen mit dem nicht neoplastischen Mammagewebe.

## **5.2 Immunhistochemie**

Mittels des monoklonalen Antikörpers Anti-Human PRLr von R&D-Systems konnte die Expression des Prolaktinrezeptorproteins in kaninen Mammatumoren und in nicht neoplastischem kaninem Mammagewebe dargestellt werden.

Eine spezifische Markierung wurde sowohl in nicht neoplastischem Gewebe (Abb. 2, 3) als auch in Adenomen (Abb. 4-6) und Adenokarzinomen (Abb. 7-9) beobachtet.

### **5.2.1 Nicht neoplastisches Gewebe**

In allen untersuchten Präparaten war eine Rezeptorausprägung vorhanden, die sich als braune Markierung in verschiedenen Zellkompartimenten darstellte. Sowohl zytoplasmatisch als auch entlang der Zellmembranen, insbesondere luminal und seitlich, war eine Anfärbung zu beobachten (Abb. 2). In zwei Präparaten fiel auch eine deutliche Färbung der Zellkerne auf. Insgesamt war die Intensität der Färbung in den nicht neoplastischen Gewebeproben sehr deutlich ausgeprägt und die Färbung vorrangig in epithelialen Zellen zu sehen. In Myoepithelzellen und im Bindegewebe wurden schwache Signale beobachtet. Blutgefäße (sowohl Endothelzellen als auch glatte Muskulatur) wiesen nur zum Teil Signale auf. Es wurden auch Reaktionen in Entzündungszellen beobachtet. Das in den Milchdrüsenalveolen enthaltene Sekret war in allen Fällen deutlich angefärbt.

### **5.2.2 Mammaadenome**

Alle Präparate der Mammaadenome zeigten Signale. Die Mehrzahl der Präparate wies eine leichtgradig geringere Färbungsintensität auf als das Normalgewebe, mit Ausnahme von vier Adenomen, bei denen die Intensität vergleichbar mit derjenigen des Normalgewebes war. Die Markierung war vor allem in Epithelzellen vorhanden, teils waren auch Myoepithelien angefärbt. Häufig wurde zusätzlich zu den zytoplasmatischen Signalen eine Färbung entlang der luminalen Zellmembranen gesehen (Abb. 4, Abb. 5). In einem Präparat fiel eine deutliche Anfärbung der basalen Epithelzellschicht auf, die oberflächlicheren Epithelzellen gaben hingegen schwächere Signale (Abb. 6). Im Bindegewebe traten etwas häufiger Signale auf als dies in den Proben von unverändertem Gewebe der Fall war, Blutgefäße waren auch hier zum Teil positiv und zum Teil negativ. Ebenfalls zeigten sich vereinzelt Signale in Entzündungszellen.



### **5.2.3 Mammaadenokarzinome**

Alle untersuchten Präparate zeigten Signale (Abb.7-9). Die Färbungsintensität war vergleichbar mit der der Adenome, in zwei Fällen jedoch auch etwas stärker ausgeprägt wie bei den Normalgewebeproben. Die Färbung war vor allem in den epithelialen Anteilen an verschiedenen subzellulären Lokalisationen deutlich ausgeprägt, im Stroma kamen nur vereinzelt Signale vor.

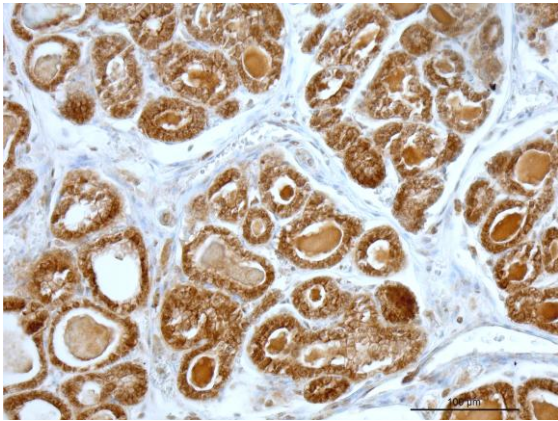


Abb. 2: Nicht neoplastisches Mammagewebe mit Signalen im Zytoplasma sowie im Sekret der Alveolen; kaum Signale im Bindegewebsstroma; Immunperoxidase-Färbung, Anti-human PRLr-Antikörper

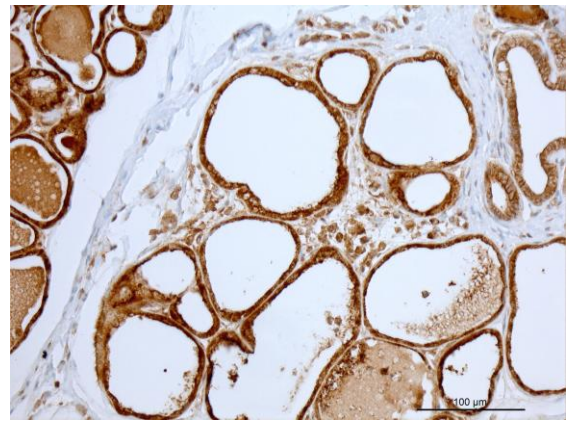


Abb. 3: Nicht neoplastisches Mammagewebe mit abgeflachten, deutlich signalgebenden Epithelzellen; Immunperoxidase-Färbung, Anti-human PRLr-Antikörper

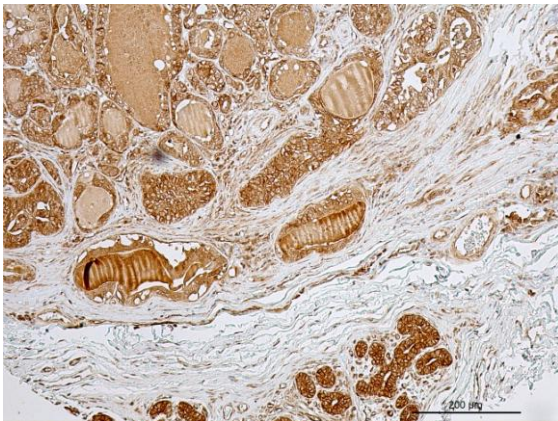


Abb. 4: Mammaadenom mit angrenzendem gesundem Mammagewebe mit stärkeren Signalen; Immunperoxidase-Färbung, Anti-human PRLr-Antikörper

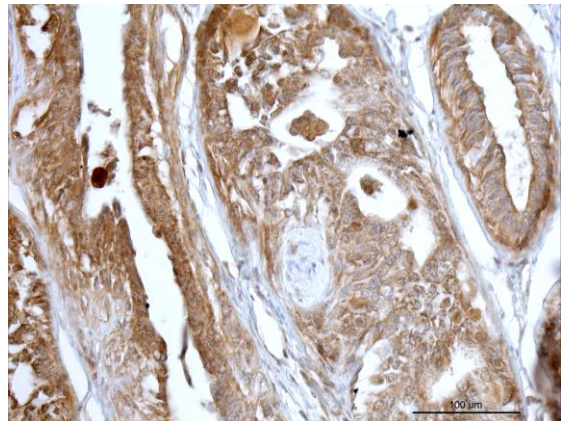


Abb. 5: Mammaadenom mit Signalen in den Epithelzellen; Immunperoxidase-Färbung, Anti-human PRLr-Antikörper

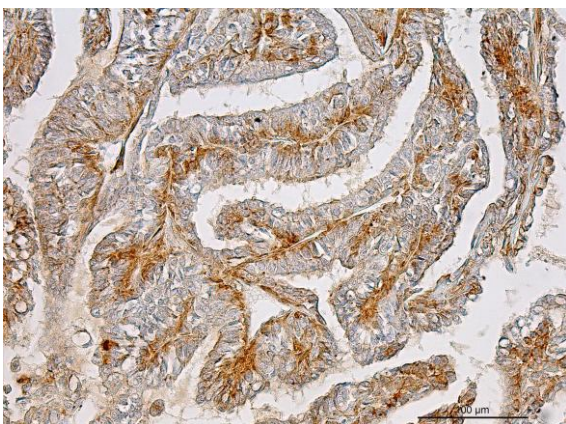


Abb. 6: Mammaadenom mit Signalen in der basalen Epithelzellschicht; Immunperoxidase-Färbung, Anti-human PRLr-Antikörper



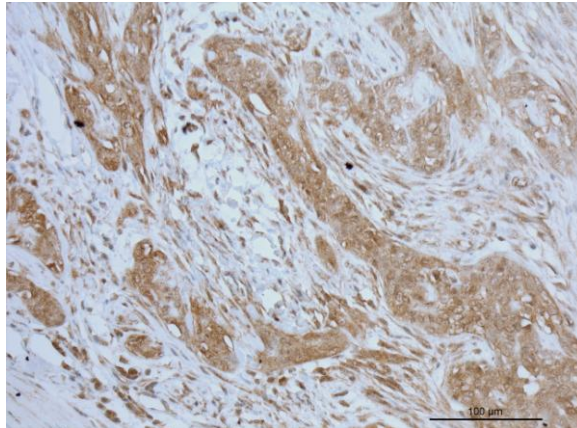


Abb. 7: Mammaadenokarzinom, Anfärbung der epithelialen Anteile, vereinzelte Signale im Stroma; Immunperoxidase-Färbung, Anti-human PRLr-Antikörper

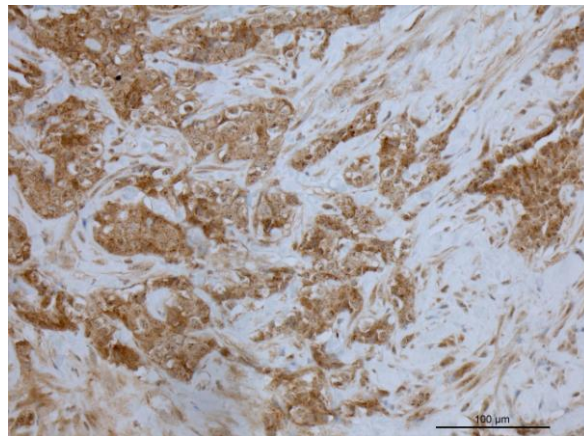


Abb. 8: Mammaadenokarzinom mit deutlichen Signalen; Immunperoxidase-Färbung, Anti-human PRLr-Antikörper

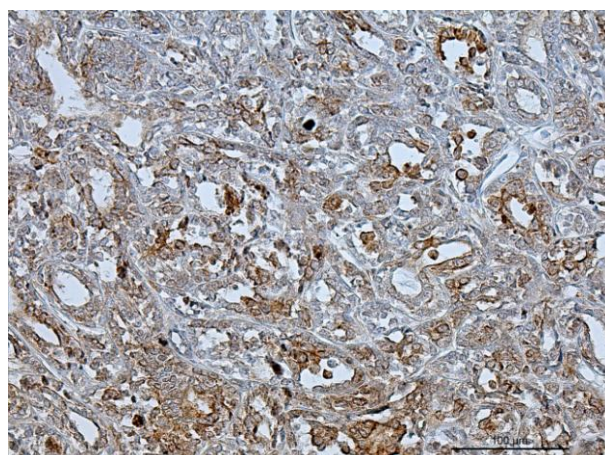


Abb. 9: Mammaadenokarzinom mit schwach sichtbaren Signalen; Immunperoxidase-Färbung, Anti-human PRLr-Antikörper

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Studie konnte erstmals ein immunhistochemischer Nachweis des Prolaktinrezeptors beim Hund etabliert und dessen Expression auf Proteinebene (Immunhistochemie) und auf mRNA-Ebene (quantitative Real Time PCR) sowohl in nicht neoplastischem als auch in benigne oder maligne verändertem kaninem Mammagewebe gezeigt werden. Alle untersuchten Proben, d.h. sowohl Normalgewebe, Adenome und Adenokarzinome waren prolaktinrezeptorpositiv, wobei der Prolaktinrezeptor heterogen in verschiedenen subzellulären Lokalisationen exprimiert wurde. Eine deutliche immunhistochemische Anfärbung war sowohl im Zytoplasma als auch entlang der luminalen Zellmembranen und in den Zellkernen der Mammaepithelzellen nachweisbar. Stromazellen und Endothelzellen reagierten nur vereinzelt positiv. Normalgewebe exprimiert am meisten Prolaktinrezeptoren, was sowohl deskriptiv in der Immunhistochemie als auch quantitativ in der Real Time PCR gezeigt wurde. Darüber hinaus konnte eine geringere Prolaktinrezeptorexpression in malignen Tumoren verglichen mit benigne entartetem Mammagewebe mittels der Real Time PCR nachgewiesen werden.

Es gibt nur zwei Arbeiten, welche bisher die Prolaktinrezeptorexpression in kaninen Mammatumorzellen untersucht haben. Rutteman et al. stellten bei der Untersuchung von Gewebeproben ebenfalls eine Abnahme der Prolaktinrezeptoren in malignen Tumoren gegenüber benignen fest. In dieser Untersuchung waren jedoch nur wenige maligne Tumoren rezeptorpositiv; im Gegensatz dazu waren alle Proben von gesundem Mammagewebe und von benignen Tumoren rezeptorpositiv (108). Die verwendete Radioimmunoassaymethode erscheint heute methodisch veraltet und ergab auch in humanmedizinischen Untersuchungen tiefere Expressionsraten als moderne Methoden (32). Van Garderen et al. konnten in einer Zellkulturstudie mit kaninen Mammatumorzellen mittels RT-PCR zeigen, dass CMT-U335 Zellen Prolaktinrezeptoren exprimieren, allerdings wurde die Expressionsrate nicht quantitativ mit normalen Mammaepithelzellen verglichen (133). Bei den meisten Untersuchungen über Brustkrebs bei Frauen war die Expressionsrate in malignen Tumoren gegenüber benignen und gegenüber Normalgewebe gleich oder vermindert (17,33,75,103). Nur wenige Studien wiesen eine verstärkte Prolaktinrezeptorexpression in malignen Tumoren nach (30,122). Die beobachtete heterogene subzelluläre Lokalisation des Prolaktinrezeptors (Zytoplasma, Zellkerne,

teilweise luminale Zellmembranen der Mammaepithelzellen), die Färbung von Myoepithelzellen sowie die schwache Färbung einzelner Stromazellen war übereinstimmend mit den meisten Ergebnissen humanmedizinischer Untersuchungen (6,17,75,103,122). Die auch in der vorliegenden Studie gelegentlich festgestellte Färbung von Endothelzellen und glatter Muskulatur der Blutgefäße könnte auf eine Beteiligung von Prolaktin bei der Angiogenese dieser Tumoren hinweisen (75,103). Unterschiede in der Lokalisation des Prolaktinrezeptors zwischen Normalgewebe, malignen und benignen Tumoren, wie sie Gill et al und Ferreira et al zeigten, waren in unserer Studie nicht nachvollziehbar: In der Arbeit von Gill et al wiesen Normalgewebeproben hauptsächlich eine Rezeptorexpression entlang der luminalen Zellgrenzen auf, benigne Tumoren zeigten eine Markierung sowohl an den luminalen Zellgrenzen als auch im Zytoplasma, während maligne Tumoren den Rezeptor hauptsächlich zytoplasmatisch exprimierten. Ähnliche Resultate erzielten Ferreira et al, die Gynäkomastien und Mammakarzinome beim Mann untersuchten: Bei den Gynäkomastien wurde die Rezeptorexpression hauptsächlich entlang der luminalen Zellgrenzen beobachtet, während bei den Karzinomen die Markierung zumeist im Zytoplasma lokalisiert war (30,33).

Unsere Ergebnisse scheinen einer Studie zu widersprechen, in welcher der Prolaktinspiegel in Gewebshomogenaten von normaler kaniner Mamma sowie benignen und malignen Tumoren gemessen und eine signifikante Assoziation mit der Malignität des Tumors festgestellt wurde. Zwar zeigten in dieser Studie maligne Tumoren die höchsten Prolaktinspiegel, jedoch bleibt unklar, ob diese Gewebespiegel auch mit dem Prolaktinrezeptorstatus in Zusammenhang stehen, da weder die Expression des Prolaktinrezeptors noch das Vorhandensein von lokal exprimiertem Prolaktin untersucht wurde (97).

Für die Tatsache, dass die Prolaktinrezeptorexpression quantitativ bei kaninem Normalgewebe am höchsten und bei malignen Tumoren am tiefsten ist, können verschiedene Erklärungsmodelle herangezogen werden. Am plausibelsten erscheint die These, dass Prolaktinrezeptoren ein Differenzierungsmerkmal von Mammaepithelzellen sind und dass der Verlust dieses Merkmals als Zeichen der Dedifferenzierung gewertet werden muss. Prolaktin ist sehr gut charakterisiert als terminaler Differenzierungsfaktor für Mammaepithelzellen und ist sowohl als Regulator der Epithelplastizität als auch als Hemmer der Invasivität und des metastatischen Potentials von Bedeutung (3,28,87,116,117,123,137). Eine

Einstufung des Prolaktinrezeptors als Differenzierungsfaktor lässt sich sehr gut damit vereinbaren, dass auch Steroidhormonrezeptoren bei kaninen Mammatumoren Differenzierungsfaktoren sind: Mit steigender Malignität des Tumors sinkt der Steroidhormonrezeptorgehalt, in Metastasen sind keine Steroidhormonrezeptoren mehr nachweisbar (24,29,69,121). Vor diesem Hintergrund überraschen die Befunde der oben erwähnten Studie von Queiroga et al., da bei den untersuchten Gewebshomogenaten nicht nur die Prolaktinspiegel, sondern auch die Steroidhormonspiegel bei malignen Tumoren deutlich höher waren als bei benignen Tumoren und bei Normalgewebe (97).

Des Weiteren muss ein Prolaktineinfluss auf die Mammatumorbildung und -progression nicht zwingend mit einer erhöhten Prolaktinrezeptorexpression in Tumoren korrelieren. Schon eine relativ geringe Expressionsrate genügt, um in menschlichen Brustkrebs-Zelllinien eine Prolaktinwirkung zu vermitteln (32). Dabei können insbesondere Veränderungen der prolaktininduzierten intrazellulären Signalwege die Tumorbildung initiieren und fördern, da diese Signalwege physiologischerweise bei der Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung sowie der Regulation von Zellzyklus und Apoptose essenziell sind (73,74,96,123). Ausserdem könnten eine Stabilisierung des Prolaktinrezeptors gegenüber Abbauvorgängen und damit eine Verstärkung der Prolaktinwirkung auf das Gewebe sowie Rezeptormutationen, die auch ohne Prolaktinbindung dauernd aktiv sind, auch beim Hund eine Rolle spielen (7,22,67,96). Beim Menschen kann Prolaktin seine proliferative und tumorfördernde Wirkung auch über den Östrogenrezeptor entfalten (41,118). Ob dies beim Hund ebenfalls möglich ist, bleibt abzuklären. In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Prolaktin auch in der Lage ist, eine Downregulation des Prolaktinrezeptors und somit ein negatives Feedback auszulösen (119). Somit könnte trotz Prolaktineinfluss eine verminderte Rezeptorexpression vorliegen.

Obwohl sich kanine und humane Mammatumoren in ihrem molekularbiologischen Verhalten in vielen Beziehungen sehr stark ähneln (61,62,83,86,88,89,91,92,105,113,131), ist es auch möglich, dass die Bedeutung von Prolaktin für die kanine Mammatumorentstehung eine grundlegend andere ist als beim Menschen. Einerseits ist unklar, ob Prolaktin beim Hund, wie dies beim Menschen der Fall ist, auch ausserhalb einer Schwangerschaft bzw. Trächtigkeit lokal in der Mamma exprimiert wird. Eigene vorläufige Daten lassen jedenfalls daran zweifeln. Eine extrahypophysäre Prolaktinexpression ist beim Menschen häufiger als

bei Tieren (18,28). Falls beim Hund ausserhalb der Trächtigkeit keine Prolaktinproduktion in der Mamma stattfindet, wäre dies ein essenzieller Unterschied zum Menschen, und die autokrine und parakrine tumorfördernde Wirkung von Prolaktin auf Mammatumoren würde komplett wegfallen. Zum anderen ist noch unbekannt, ob sich die Prolaktinserumspiegel bei der Hündin ähnlich wie die der Frau verhalten. Ein deutlicher Anstieg der Gonadotropinserumspiegel findet bei Frauen in der reproduktiven Seneszenz und langfristig bei der Hündin nach Kastration statt (100-102). Ob diese Analogie auf Prolaktin übertragbar ist, bleibt noch zu untersuchen. Bei der Frau sinkt die Prolaktinkonzentration im Blut nach der Menopause stark ab, postmenopausale Frauen haben Prolaktinkonzentrationen vergleichbar derer von Männern. Dieser Unterschied zwischen prä- und postmenopausalen Frauen wird mit der Abnahme der Östrogensekretion in den Wechseljahren und dem damit auftretenden Wegfall der fördernden Wirkung von Östrogenen auf die Prolaktinsekretion begründet (56). Während bei intakten und gonadektomierten Rüden die Prolaktinkonzentrationen gleich sind, induziert interessanterweise die Kastration bei männlichen Katzen, ebenso wie bei der Ratte und beim Frettchen, eine persistierende Hyperprolaktinämie, obwohl es bei den weiblichen Tieren ja ebenfalls zu einem Wegfall der Östrogenwirkung kommt (45,70). Eine Limitation der vorliegenden Pilotstudie ist die relativ geringe Probenzahl. Obwohl bei der Auswahl der Proben versucht wurde, externe Variablen so gut wie möglich auszuschliessen, indem nur Proben von intakten Hündinnen verwendet wurden, konnte der Zyklusstand der betroffenen Hündinnen retrospektiv nicht mehr genau evaluiert werden. Zur sicheren Zyklusbestimmung der Hündin sind eine klinische Untersuchung sowie eine vaginalzytologische bzw. hormonelle Untersuchung notwendig (99). Eine Entnahme der Mammatumoren während dem Östrus, also unter der Phase der Östrogendominanz, erscheint höchst unwahrscheinlich, da alle Hündinnen klinisch als nicht läufig eingestuft worden waren. Eine Entnahme während dem Metöstrus, also der Phase der Progesterondominanz, kann hingegen nicht sicher ausgeschlossen werden. Beim weiblichen Schwein konnte gezeigt werden, dass nur Östrogen, nicht aber Progesteron alleine oder in Kombination mit Östrogen einen Effekt auf die Prolaktinrezeptorexpression hat (124). Im Übrigen wurde der Zyklusstand in keiner der Autorin bekannten veterinärmedizinischen Studie und ebenso wenig bei den humanmedizinischen Untersuchungen berücksichtigt, dies sollte deshalb die

Vergleichbarkeit der vorliegenden Arbeit nicht beeinträchtigen. Auch die Unterscheidung kastriert/intakt bzw. prä-/postmenopausal wurde weder in veterinär- noch in humanmedizinischen Arbeiten gemacht (97,108).

Bedingt durch die retrospektive Natur der vorliegenden Studie konnten die Serumprolaktinspiegel der von den Mammatumoren betroffenen Hündinnen nicht evaluiert werden. Während ältere Arbeiten keinen Unterschied in den Serumprolaktinspiegeln zwischen Hündinnen mit benignen und malignen Tumoren feststellten (46,107), waren in einer neueren Arbeit die Serumprolaktinspiegel bei Hündinnen mit Mammatumoren signifikant erhöht (97). Allerdings ist der Vergleich von Serumprolaktinwerten relativ stark fehleranfällig: Prolaktin wird pulsatil ausgeschüttet und schwankt saisonal, zyklusbedingt und individuell stark (20,35,58,60,70). Des Weiteren sind die Prolaktinserumspiegel rasseabhängig (21,35,130). Stress, zum Beispiel durch eine Blutentnahme, kann zur Erhöhung der Prolaktinausschüttung führen (70). Die oben aufgeführten Gründe machen einen Vergleich der Prolaktinwerte bei kleinen Studienpopulationen enorm schwierig und wenig aussagekräftig.

Sehr interessant wäre bei der vorliegenden Studie eine gleichzeitige Evaluation der Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression. Ob Prolaktinrezeptoren und Steroidhormonrezeptoren koexprimiert werden, ist auch bei der Frau noch widersprüchlich (8,17,33,90,103). Die Studie von Queiroga et al. lässt einen Zusammenhang zwischen Steroidhormonen und Prolaktin beim Hund vermuten, auch wenn nur Gewebshomogenatspiegel von Prolaktin und nicht die Rezeptorexpression bestimmt wurde (97).

Schlussfolgerungen der vorliegenden Arbeit sind, dass Prolaktinrezeptoren nicht nur in der normalen kaninen Mamma, sondern auch in Mammatumoren exprimiert werden und dass die Expression mit zunehmender Malignität abnimmt. Dieses Erkenntnis ist neu und impliziert verschiedene Hypothesen. So könnte die abnehmende Rezeptorexpression als Differenzierungsverlust maligner Zellen interpretiert werden. Theoretisch denkbar wäre ebenfalls, dass auch bei abnehmender Rezeptorexpression Prolaktin eine Wirkung auf die Mammatumorgenese beim Hund hat. Dies könnte indirekt z.B. über die Östrogenrezeptoren erfolgen. Bis anhin ist jedoch unklar, ob und inwieweit Prolaktin die Pathogenese von Mammatumoren beim Hund beeinflusst. Die vorliegenden Ergebnisse werfen noch weitere neue Fragen auf, so zum Beispiel, ob die kanine



Mamma lokal Prolaktin synthetisiert. Im Weiteren interessiert das Verhalten der Serumprolaktinspiegel bei der Hündin in Abhängigkeit vom gonadalen Status. Zellkulturstudien an kaninen normalen Mammaepithelzellen und Mammatumorzellen könnten weitere Erkenntnisse über Veränderungen im Prolaktin-Signaling und über das Zusammenwirken mit Steroidhormonen liefern. Diese Fragen zur Bedeutung von Prolaktin für die kanine Mammatumorentstehung und –progression müssen in zukünftigen Studien geklärt werden.

## 7 Referenzen

1. Asai S, Ohta R, Fujikawa T, Sakai RR, Shirota M, Ogata M, Watanabe G, Taya K. Gastric ulceration and expression of prolactin receptor in the brain in Hatano high- and low-avoidance rats. *Endocrine* 2006;30: 161-166.
2. Bachelot A, Binart N. Reproductive role of prolactin. *Reproduction* 2007;133: 361-369.
3. Ballestar E, Paz MF, Valle L, Wei S, Fraga MF, Espada J, Cigudosa JC, Huang TH, Esteller M. Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *Embo J* 2003;22: 6335-6345.
4. Bazan JF. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164: 788-795.
5. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 2008;29: 1-41.
6. Bhatavdekar JM, Patel DD, Shah NG, Vora HH, Suthar TP, Ghosh N, Chikhlikar PR, Trivedi TI. Prolactin as a local growth promoter in patients with breast cancer: GCRI experience. *Eur J Surg Oncol* 2000;26: 540-547.
7. Bogorad RL, Courtillot C, Mestayer C, Bernichtein S, Harutyunyan L, Jomain JB, Bachelot A, Kuttann F, Kelly PA, Goffin V, Touraine P. Identification of a gain-of-function mutation of the prolactin receptor in women with benign breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105: 14533-14538.
8. Bonneterre J, Peyrat JP, Beuscart R, Demaille A. Biological and clinical aspects of prolactin receptors (PRL-R) in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990;37: 977-981.
9. Boot LM, Muhlbock O. Mammary gland carcinogenesis by isografts of pituitaries in mice. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1959;15: 134-136.
10. Boot LM, Ropcke G, Muhlbock O. Mammary tumour induction by pituitary isografts in mice. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1962;18: 270-271.
11. Boyns AR, Buchan R, Cole EN, Forrest AP, Griffiths K. Basal prolactin blood levels in three strains of rat with differing incidence of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary tumours. *Eur J Cancer* 1973;9: 169-171.
12. Brisken C, Kaur S, Chavarria TE, Binart N, Sutherland RL, Weinberg RA, Kelly PA, Ormandy CJ. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol* 1999;210: 96-106.
13. Brodey RS, Goldschmidt MH, Roszel JR. Canine mammary neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc* 1983;19: 61-90.
14. Carver KC, Arendt LM, Schuler LA. Complex prolactin crosstalk in breast cancer: new therapeutic implications. *Mol Cell Endocrinol* 2009;307: 1-7.
15. Choy VJ, Nixon AJ, Pearson AJ. Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in ovine skin and changes during the wool follicle growth cycle. *J Endocrinol* 1997;155: 265-275.
16. Clevenger CV. Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer. *Breast Dis* 2003;18: 75-86.
17. Clevenger CV, Chang WP, Ngo W, Pasha TL, Montone KT, Tomaszewski JE. Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma. Evidence for an autocrine/paracrine loop. *Am J Pathol* 1995;146: 695-705.

18. Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev* 2003;24: 1-27.
19. Concannon PW, Yeager AE. Endocrine, ultrasonographic, radiographic and clinical changes during pregnancy, parturition and lactation in dogs. *Inc Proc Soc Theriogenology Ann Mtg.*, 1990;197-223.
20. Corrada Y, Castex G, Sosa Y, Gobello C. Secretory patterns of prolactin in dogs: circannual and ultradian rhythms. *Reprod Domest Anim* 2003;38: 219-223.
21. Corrada Y, Rimoldi I, Arreseigor S, Marecco G, Gobello C. Prolactin reference range and pulsatility in male dogs. *Theriogenology* 2006;66: 1599-1602.
22. Courtillot C, Chakhtoura Z, Bogorad R, Genestie C, Bernichtein S, Badachi Y, Janaud G, Akakpo JP, Bachelot A, Kuttenn F, Goffin V, Touraine P. Characterization of two constitutively active prolactin receptor variants in a cohort of 95 women with multiple breast fibroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab*;95: 271-279.
23. Di Carlo R, Muccioli G. Prolactin receptor in human mammary carcinoma. *Tumori* 1979;65: 695-702.
24. Donnay I, Rauis J, Devleeschouwer N, Wouters-Ballman P, Leclercq G, Verstegen J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am J Vet Res* 1995;56: 1188-1194.
25. Dorn CR, Taylor DO, Schneider R, Hibbard HH, Klauber MR. Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst* 1968;40: 307-318.
26. El Etreby MF, Muller-Peddinghaus R, Bhargava AS, El Bab MR, Graf KJ, Trautwein G. The role of the pituitary gland in spontaneous canine mammary tumorigenesis. *Vet Pathol* 1980;17: 2-16.
27. Eliassen AH, Tworoger SS, Hankinson SE. Reproductive factors and family history of breast cancer in relation to plasma prolactin levels in premenopausal and postmenopausal women. *Int J Cancer* 2007;120: 1536-1541.
28. Fernandez I, Touraine P, Goffin V. Prolactin and human tumorogenesis. *J Neuroendocrinol*.
29. Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet Comp Oncol* 2009;7: 230-235.
30. Ferreira M, Mesquita M, Quaresma M, Andre S. Prolactin receptor expression in gynaecomastia and male breast carcinoma. *Histopathology* 2008;53: 56-61.
31. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000;80: 1523-1631.
32. Galsgaard ED, Rasmussen BB, Folkesson CG, Rasmussen LM, Berchtold MW, Christensen L, Panina S. Re-evaluation of the prolactin receptor expression in human breast cancer. *J Endocrinol* 2009;201: 115-128.
33. Gill S, Peston D, Vonderhaar BK, Shousha S. Expression of prolactin receptors in normal, benign, and malignant breast tissue: an immunohistological study. *J Clin Pathol* 2001;54: 956-960.
34. Ginsburg E, Vonderhaar BK. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995;55: 2591-2595.

35. Gobello C, Bolognani F, de la Sota RL, Goya RG. Twenty-four-hour profiles of serum prolactin and luteinizing hormone in anoestrous crossbred bitches. *Reprod Domest Anim* 2001;36: 41-45.
36. Gobello C, Colombani M, Scaglia H, De La Sota RL, Goya RG. Heterogeneity of circulating prolactin in the bitch. *Reprod Nutr Dev* 2001;41: 505-511.
37. Gobello C, W. CP, J. V. Canine Pseudopregnancy: A Review. In: Concannon PW, England G, Verstegen J, Linde-Forsberg C (eds), *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service, [www.ivis.org](http://www.ivis.org), 2001.
38. Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelly PA. Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol* 2002;64: 47-67.
39. Goffin V, Touraine P, Pichard C, Bernichtein S, Kelly PA. Should prolactin be reconsidered as a therapeutic target in human breast cancer? *Mol Cell Endocrinol* 1999;151: 79-87.
40. Goldhar AS, Vonderhaar BK, Trott JF, Hovey RC. Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. *Mol Cell Endocrinol* 2005;232: 9-19.
41. Gonzalez L, Zambrano A, Lazaro-Trueba I, Lopez E, Gonzalez JJ, Martin-Perez J, Aranda A. Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene* 2009;28: 1298-1308.
42. Gopinath C. The predictive value of pathological findings in animal toxicity studies. *J Toxicol Pathol* 1995;8: 89-100.
43. Grattan DR. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction* 2002;123: 497-506.
44. Grattan DR, Kokay IC. Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 2008;20: 752-763.
45. Guenzel-Apel AR, Seefeldt A, Eschricht FM, Urhausen C, Kramer S, Mischke R, Hoppen HO, Beyerbach M, Koivisto M, Dieleman SJ. Effects of gonadectomy on prolactin and LH secretion and the pituitary-thyroid axis in male dogs. *Theriogenology* 2009;71: 746-753.
46. Hamilton JM, Knight PJ, Beevers J, Else RW. Serum prolactin concentrations in canine mammary cancer. *Vet Rec* 1978;102: 127-128.
47. Hankinson SE. Endogenous hormones and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Breast Dis* 2005;24: 3-15.
48. Hankinson SE, Willett WC, Michaud DS, Manson JE, Colditz GA, Longcope C, Rosner B, Speizer FE. Plasma prolactin levels and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1999;91: 629-634.
49. Harvey PW. Human relevance of rodent prolactin-induced non-genotoxic mammary carcinogenesis: prolactin involvement in human breast cancer and significance for toxicology risk assessments. *J Appl Toxicol* 2005;25: 179-183.
50. Harvey PW, Everett DJ, Springall CJ. Hyperprolactinaemia as an adverse effect in regulatory and clinical toxicology: role in breast and prostate cancer. *Hum Exp Toxicol* 2006;25: 395-404.
51. Holdaway IM, Friesen HG. Hormone binding by human mammary carcinoma. *Cancer Res* 1977;37: 1946-1952.
52. Howell SJ, Anderson E, Hunter T, Farnie G, Clarke RB. Prolactin receptor antagonism reduces the clonogenic capacity of breast cancer cells and potentiates doxorubicin and paclitaxel cytotoxicity. *Breast Cancer Res* 2008;10: R68.

53. Jochle W. Prolactin in Canine and Feline Reproduction. *Reprod Domest Anim* 1997;32: 183-193.
54. Joechle W. Prolactin in Canine and Feline Reproduction. *Reprod Domest Anim* 1997;32: 183-193.
55. Johnston CA, Negro-Vilar A. Role of oxytocin on prolactin secretion during proestrus and in different physiological or pharmacological paradigms. *Endocrinology* 1988;122: 341-350.
56. Katznelson L, Riskind PN, Saxe VC, Klibanski A. Prolactin pulsatile characteristics in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83: 761-764.
57. Knight PG, Howles CM, Cunningham FJ. Evidence that opioid peptides and dopamine participate in the suckling-induced release of prolactin in the ewe. *Neuroendocrinology* 1986;44: 29-35.
58. Kooistra HS. Adenohypophyseal Function in Healthy Dogs and in Dogs with Pituitary Disease. Utrecht University: Thesis, 2000.
59. Kooistra HS, Okkens AC. Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review. *Mol Cell Endocrinol* 2002;197: 167-172.
60. Kreeger TJ, Seal US. Circannual prolactin rhythm in intact dogs housed outdoors. *Chronobiologia* 1992;19: 1-8.
61. Kumaraguruparan R, Karunakaran D, Balachandran C, Manohar BM, Nagini S. Of humans and canines: a comparative evaluation of heat shock and apoptosis-associated proteins in mammary tumors. *Clin Chim Acta* 2006;365: 168-176.
62. Kumaraguruparan R, Prathiba D, Nagini S. Of humans and canines: Immunohistochemical analysis of PCNA, Bcl-2, p53, cytokeratin and ER in mammary tumours. *Res Vet Sci* 2006;81: 218-224.
63. Lafuente A, Marco J, Esquifino AI. Physiological roles of thyrotrophin-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide on the pulsatile secretory patterns of prolactin in pituitary-grafted female rats. *J Endocrinol* 1994;142: 581-586.
64. Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ. Tumors of the Mammary Gland. In: Withrow SJ, Vail DM (eds), *Small Animal Clinical Oncology*. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007;619-636.
65. Lapensee EW, Schwemberger SJ, Lapensee CR, Bahassi EM, Afton S, Ben-Jonathan N. Prolactin confers resistance against cisplatin in breast cancer cells by activating glutathione-S-transferase. *Carcinogenesis* 2009.
66. Levina VV, Nolen B, Su Y, Godwin AK, Fishman D, Liu J, Mor G, Maxwell LG, Herberman RB, Szczepanski MJ, Szajnik ME, Gorelik E, Lokshin AE. Biological significance of prolactin in gynecologic cancers. *Cancer Res* 2009;69: 5226-5233.
67. Li Y, Clevenger CV, Minkovsky N, Kumar KG, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Spiegelman VS, Fuchs SY. Stabilization of prolactin receptor in breast cancer cells. *Oncogene* 2006;25: 1896-1902.
68. Martin de Las Mulas J, Millan Y, Dios R. A Prospective Analysis of Immunohistochemically Determined Estrogen Receptor  $\alpha$  and Progesterone Receptor Expression and Host and Tumor Factors as Predictors of Disease-free Period in Mammary Tumors of the Dog. *Vet Pathol* 2005;42: 200-212.
69. Martin de Las Mulas J, Ordas J, Millan MY, Chacon M, De Lara F, Espinosa de los Monteros A, Reymundo C, Jover A. Immunohistochemical expression of estrogen receptor beta in normal and tumoral canine mammary glands. *Vet Pathol* 2004;41: 269-272.

70. Martin LJM, Siliart B, Dumon HJW, Nguyen P. Spontaneous hormonal variations in male cats following gonadectomy. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2006;8: 309-314.
71. Matsumoto H, Noguchi J, Horikoshi Y, Kawamata Y, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259: 321-324.
72. Maus MV, Reilly SC, Clevenger CV. Prolactin as a chemoattractant for human breast carcinoma. *Endocrinology* 1999;140: 5447-5450.
73. McHale K, Tomaszewski JE, Puthiyaveetil R, Livolsi VA, Clevenger CV. Altered expression of prolactin receptor-associated signaling proteins in human breast carcinoma. *Mod Pathol* 2008;21: 565-571.
74. Meng J, Tsai-Morris CH, Dufau ML. Human prolactin receptor variants in breast cancer: low ratio of short forms to the long-form human prolactin receptor associated with mammary carcinoma. *Cancer Res* 2004;64: 5677-5682.
75. Mertani HC, Garcia-Caballero T, Lambert A, Gerard F, Palayer C, Boutin JM, Vonderhaar BK, Waters MJ, Lobie PE, Morel G. Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders. *Int J Cancer* 1998;79: 202-211.
76. Millanta F, Calandrella M, Bari G, Niccolini M, Vannozzi I, Poli A. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. *Res Vet Sci* 2005;79: 225-232.
77. Misdorp W. Progestagens and mammary tumours in dogs and cats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;125 Suppl 1: 27-31.
78. Misdorp W, Else RW. Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. In: Pathology AFlo (ed): American Registry of Pathology, 2001.
79. Moe L. Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl* 2001;57: 439-443.
80. Moulton JE, Rosenblatt LS, Goldman M. Mammary tumors in a colony of beagle dogs. *Vet Pathol* 1986;23: 741-749.
81. Mujagic Z, Mujagic H. Importance of serum prolactin determination in metastatic breast cancer patients. *Croat Med J* 2004;45: 176-180.
82. Mujagic Z, Mujagic H, Prnjavorac B. Circulating levels of prolactin in breast cancer patients. *Med Arh* 2005;59: 33-35.
83. Nerurkar A, Osin P. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: the role of new diagnostic techniques. *Breast Cancer Res* 2003;5: 305-308.
84. Nerurkar VR, Seshadri R, Mulherkar R, Ishwad CS, Lalitha VS, Naik SN. Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *Int J Cancer* 1987;40: 230-232.
85. Nieto A, Pena L, Perez-Alenza MD, Sanchez MA, Flores JM, Castano M. Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 2000;37: 239-247.
86. Nieto A, Perez-Alenza MD, Del Castillo N, Tabanera E, Castano M, Pena L. BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J Comp Pathol* 2003;128: 260-268.
87. Nouhi Z, Chughtai N, Hartley S, Cocolakis E, Lebrun JJ, Ali S. Defining the role of prolactin as an invasion suppressor hormone in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66: 1824-1832.

88. Ochiai K, Morimatsu M, Tomizawa N, Syuto B. Cloning and sequencing full length of canine Brca2 and Rad51 cDNA. *J Vet Med Sci* 2001;63: 1103-1108.
89. Okobia MN, Bunker CH. Molecular epidemiology of breast cancer: a review. *Afr J Reprod Health* 2003;7: 17-28.
90. Ormandy CJ, Hall RE, Manning DL, Robertson JF, Blamey RW, Kelly PA, Nicholson RI, Sutherland RL. Coexpression and cross-regulation of the prolactin receptor and sex steroid hormone receptors in breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82: 3692-3699.
91. Paolini M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer* 2008;8: 147-155.
92. Parodi AL, Mialot JP, al. e. Canine and Feline Mammary Cancers as Animal Models for Hormone-Dependent Human Breast Tumors: Relationships Between Steroid Receptor Profiles and Survival Rates. In: Bresciani F, al. e (eds), *Progress in Cancer Research and Therapy*. New York: Raven Press, 1984.
93. Peirce SK, Chen WY, Chen WY. Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR. *J Endocrinol* 2001;171: R1-4.
94. Perez Alenza MD, Pena L, del Castillo N, Nieto AI. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* 2000;41: 287-291.
95. Perks CM, Keith AJ, Goodhew KL, Savage PB, Winters ZE, Holly JM. Prolactin acts as a potent survival factor for human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2004;91: 305-311.
96. Plotnikov A, Varghese B, Tran TH, Liu C, Rui H, Fuchs SY. Impaired turnover of prolactin receptor contributes to transformation of human breast cells. *Cancer Res* 2009;69: 3165-3172.
97. Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes C, Illera JC. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94: 181-187.
98. Rae-Venter B, Nemoto T, Schneider SL, Dao TL. Prolactin binding by human mammary carcinoma: relationship to estrogen receptor protein concentration and patient age. *Breast Cancer Res Treat* 1981;1: 233-243.
99. Rehm S, Stanislaus DJ, Williams AM. Estrous cycle-dependent histology and review of sex steroid receptor expression in dog reproductive tissues and mammary gland and associated hormone levels. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007;80: 233-245.
100. Reichler IM, Barth A, Piche CA, Jochle W, Roos M, Hubler M, Arnold S. Urodynamic parameters and plasma LH/FSH in spayed Beagle bitches before and 8 weeks after GnRH depot analogue treatment. *Theriogenology* 2006;66: 2127-2136.
101. Reichler IM, Pfeiffer E, Piche CA, Jochle W, Roos M, Hubler M, Arnold S. Changes in plasma gonadotropin concentrations and urethral closure pressure in the bitch during the 12 months following ovariectomy. *Theriogenology* 2004;62: 1391-1402.
102. Reichler IM, Welle M, Eckrich C, Sattler U, Barth A, Hubler M, Nett-Mettler CS, Jochle W, Arnold S. Spaying-induced coat changes: the role of gonadotropins, GnRH and GnRH treatment on the hair cycle of female dogs. *Vet Dermatol* 2008;19: 77-87.

103. Reynolds C, Montone KT, Powell CM, Tomaszewski JE, Clevenger CV. Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. *Endocrinology* 1997;138: 5555-5560.
104. Rivera JC, Aranda J, Riesgo J, Nava G, Thebault S, Lopez-Barrera F, Ramirez M, Martinez de la Escalera G, Clapp C. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res* 2008;86: 314-321.
105. Rungsipipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N, Hayashi T. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J Vet Med Sci* 1999;61: 27-32.
106. Rutteman GR. Hormones and mammary tumour disease in the female dog: an update. *In Vivo* 1990;4: 33-40.
107. Rutteman GR, Bevers MM, Misdorp W, Van den Brom WE. Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors: II. Prolactin. *Anticancer Res* 1989;9: 241-245.
108. Rutteman GR, Willekes-Koolschijn N, Bevers MM, Van der Gugten AA, Misdorp W. Prolactin binding in benign and malignant mammary tissue of female dogs. *Anticancer Res* 1986;6: 829-835.
109. Schneider R, Dorn CR, Taylor DO. Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst* 1969;43: 1249-1261.
110. Shafik A. Prolactin injection, a new contraceptive method: experimental study. *Contraception* 1994;50: 191-199.
111. Sinha YN, Salocks CB, Vanderlaan WP. Prolactin and growth hormone levels in different inbred strains of mice: patterns in association with estrous cycle, time of day, and perphenazine stimulation. *Endocrinology* 1975;97: 1112-1122.
112. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003;33: 573-596.
113. Sorenmo KU, Kristiansen VM, Cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Langeland M, Mongil CM, Grondahl AM, Teige J, Goldschmidt MH. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol* 2009;7: 162-172.
114. Stovring M, Moe L, Glatte E. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *Apmis* 1997;105: 590-596.
115. Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 1246-1251.
116. Sultan AS, Brim H, Sherif ZA. Co-overexpression of Janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 5a promotes differentiation of mammary cancer cells through reversal of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Sci* 2008;99: 272-279.
117. Sultan AS, Xie J, LeBaron MJ, Ealley EL, Nevalainen MT, Rui H. Stat5 promotes homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells. *Oncogene* 2005;24: 746-760.



118. Swaminathan G, Varghese B, Fuchs SY. Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13: 81-91.
119. Swaminathan G, Varghese B, Thangavel C, Carbone CJ, Plotnikov A, Kumar KG, Jablonski EM, Clevenger CV, Goffin V, Deng L, Frank SJ, Fuchs SY. Prolactin stimulates ubiquitination, initial internalization, and degradation of its receptor via catalytic activation of Janus kinase 2. *J Endocrinol* 2008;196: R1-7.
120. Taylor GN, Shabestari L, Williams J, Mays CW, Angus W, McFarland S. Mammary neoplasia in a closed beagle colony. *Cancer Res* 1976;36: 2740-2743.
121. Thuroczy J, Reisvaag GJ, Perge E, Tibold A, Szilagyi J, Balogh L. Immunohistochemical detection of progesterone and cellular proliferation in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 2007;137: 122-129.
122. Touraine P, Martini JF, Zafrani B, Durand JC, Labaille F, Malet C, Nicolas A, Trivin C, Postel-Vinay MC, Kuttenn F, Kelly PA. Increased expression of prolactin receptor gene assessed by quantitative polymerase chain reaction in human breast tumors versus normal breast tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83: 667-674.
123. Tran TH, Utama FE, Lin J, Yang N, Sjolund AB, Ryder A, Johnson KJ, Neilson LM, Liu C, Brill KL, Rosenberg AL, Witkiewicz AK, Rui H. Prolactin inhibits BCL6 expression in breast cancer through a Stat5a-dependent mechanism. *Cancer Res*;70: 1711-1721.
124. Trott JF, Horigan KC, Gloviczki JM, Costa KM, Freking BA, Farmer C, Hayashi K, Spencer T, Morabito JE, Hovey RC. Tissue-specific regulation of porcine prolactin receptor expression by estrogen, progesterone, and prolactin. *J Endocrinol* 2009;202: 153-166.
125. Turcot-Lemay L, Kelly PA. Prolactin receptors in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1982;68: 381-383.
126. Tworoger SS, Eliassen AH, Rosner B, Sluss P, Hankinson SE. Plasma prolactin concentrations and risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Res* 2004;64: 6814-6819.
127. Tworoger SS, Eliassen AH, Sluss P, Hankinson SE. A prospective study of plasma prolactin concentrations and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25: 1482-1488.
128. Tworoger SS, Hankinson SE. Prolactin and breast cancer risk. *Cancer Lett* 2006;243: 160-169.
129. Tworoger SS, Sluss P, Hankinson SE. Association between plasma prolactin concentrations and risk of breast cancer among predominately premenopausal women. *Cancer Res* 2006;66: 2476-2482.
130. Urhausen C, Seefeldt A, Eschricht FM, Koch A, Hoppen HO, Beyerbach M, Mohrke C, Dieleman SJ, Gunzel-Apel AR. Concentrations of prolactin, LH, testosterone, TSH and thyroxine in normospermic dogs of different breeds. *Reprod Domest Anim* 2009;44 Suppl 2: 279-282.
131. Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest* 2000;18: 781-792.
132. Van de Kar LD, Rittenhouse PA, Li Q, Levy AD. Serotonergic regulation of renin and prolactin secretion. *Behav Brain Res* 1996;73: 203-208.
133. van Garderen E, Swennenhuis JF, Hellmen E, Schalken JA. Growth hormone induces tyrosyl phosphorylation of the transcription factors Stat5a and Stat5b

- in CMT-U335 canine mammary tumor cells. *Domest Anim Endocrinol* 2001;20: 123-135.
134. Verstegen-Onclin K, Verstegen J. Endocrinology of pregnancy in the dog: a review. *Theriogenology* 2008;70: 291-299.
  135. Vonderhaar BK. Prolactin involvement in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 1999;6: 389-404.
  136. Vonderhaar BK. Prolactin: the forgotten hormone of human breast cancer. *Pharmacol Ther* 1998;79: 169-178.
  137. Wagner KU, Rui H. Jak2/Stat5 signaling in mammatogenesis, breast cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13: 93-103.
  138. Wang PS, Walker AM, Tsuang MT, Orav EJ, Glynn RJ, Levin R, Avorn J. Dopamine antagonists and the development of breast cancer. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59: 1147-1154.
  139. Welsch CW, Louks G, Fox D, Brooks C. Enhancement by prolactin of carcinogen induced mammary cancerigenesis in the male rat. *Br J Cancer* 1975;32: 427-431.
  140. Wennbo H, Gebre-Medhin M, Gritli-Linde A, Ohlsson C, Isaksson OG, Tornell J. Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. *J Clin Invest* 1997;100: 2744-2751.
  141. Yokoro K, Nakano M, Ito A, Nagao K, Kodama Y. Role of prolactin in rat mammary carcinogenesis: detection of carcinogenicity of low-dose carcinogens and of persisting dormant cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1977;58: 1777-1783.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. Iris Reichler für die Überlassung des interessanten Themas, für die Übernahme des Referates und für ihre hilfsbereite und engagierte Unterstützung, auf die immer Verlass war.

Ebenfalls ein ganz grosses Dankeschön möchte ich an Frau Dr. Erika Michel richten für die zuverlässige, freundschaftliche und motivierende Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit und für das jederzeit offene Ohr bei wirklich allen Fragen und Problemen.

Auch Herrn Prof. Franco Guscetti danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates, für die Überlassung des Probenmaterials und für die fachliche Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Mariusz Kowalewski bedanken für die gute Zusammenarbeit und für die stets engagierte Unterstützung bei allen Fragen rund um die Immunhistochemie und Real Time PCR.

Auch Frau Sissi Högger und Herrn Urs Büchler möchte ich recht herzlich danken, die mir bei den Arbeiten im Labor mit Rat und Tat und grösster Hilfsbereitschaft zur Seite standen.

Ausserdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen der Abteilung für Kleintierfortpflanzung, bei Christine Eckrich Specker, Fabienne Bitterli, Julia Palm, Susanne Peterson und Katharina Staub, die durch den guten Zusammenhalt und die gegenseitige Unterstützung einen grossen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

## 9 Lebenslauf

Name	Stefanie Kathrin Feldmann
Geburtsdatum	21. Januar 1982
Geburtsort	München, Deutschland
Nationalität	Deutsche Staatsangehörige
1988 –1992	Grundschule Geltendorf, Deutschland
1992 – 2002	Viscardi-Gymnasium Fürstenfeldbruck, Deutschland
2002	Schulabschluss mit dem Abitur
2002 – 2008	Studium der Tiermedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland
2008	Staatsexamen an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland
2008-2010	Assistentin und Doktorandin an der Abteilung für Kleintierfortpflanzung des Tierspitals Zürich
2010-heute	Assistentin an der Abteilung für Kleintierchirurgie des Tierspitals Bern

## 10 Anhang

### 10.1 Protokoll Hämalaun-Eosin-Färbung

Entfernung des Paraffins:

1	Xylol I	Kurz schwenken
2	Xylol II	5 Minuten
3	Xylol III	5 Minuten
4	Alkohol 100% I	5 Minuten
5	Alkohol 100% II	5 Minuten
6	Alkohol 96% I	2 Minuten
7	Alkohol 96% II	2 Minuten
8	Alkohol 70% I	2 Minuten
9	Alkohol 70 % II	2 Minuten
10	Aqua dest.	Kurz schwenken
11	Aqua dest.	2 Minuten

Übersichtsfärbung mit Hämalaun-Eosin:

1	Hämalaun	6 Minuten
2	Fliessendes Leitungswasser	5 Minuten
3	Alkohol 80%	2 Minuten
4	Eosin, alk.	6 Minuten
5	Alkohol 100% I	2 Minuten
6	Alkohol 100% II	2 Minuten
7	Xylol I	5 Minuten
8	Xylol II	5 Minuten
9	Eindecken	

### 10.2 Protokoll RNA-Extraktion RNeasy FFPE Kit

Alle verwendeten Reagenzien und Reaktionsgefässe mit Ausnahme der in Schritt 3 verwendeten Eppendorf-Gefässe stammen aus dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Schweiz).

1. Anfertigen von 10 µm dicken Schnitten am Rotationsmikrotom (RM 2165, Leica, Deutschland)
2. Entfernung von überschüssigem Paraffin unter Verwendung zweier Nadeln
3. Überführen der Schnitte in 1,5 ml-Eppendorfgefässe

4. Hinzufügen von 1,0 ml Xylol pro Probe und Mischen durch Vortexen (Vortex Genius 3, IKA, Deutschland)
5. Zentrifugieren bei voller Geschwindigkeit für 2 Minuten bei 20-25°C (CT15RE, VWR/Hitachi, Schweiz)
6. Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes
7. Hinzufügen von 1,0 ml Ethanol 100% und Mischen durch Vortexen
8. Zentrifugieren bei voller Geschwindigkeit für 2 Minuten bei 20-25°C
9. Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes
10. Inkubieren des geöffneten Reaktionsgefäßes bei Raumtemperatur bzw. bei 37°C im Wärmeschränk für 10 Minuten bzw. bis zum vollständigen Verdampfen des restlichen Ethanols
11. Resuspendieren des Pellets mit 150 µl PKD-Puffer und Zugabe von 10 µl Proteinase K, Mischen durch Vortexen
12. Inkubieren im Wasserbad bei 55°C für 15 Minuten, direkt im Anschluss bei 80°C für 15 Minuten (Isotemp 215, Fisher Scientific, Schweiz)
13. Hinzufügen von 320 µl RBC-Puffer
14. Überführen des Lysats in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit integrierter gDNA Eliminator Spin Säule, Zentrifugieren bei >10 000 rpm für 15 Sekunden, Verwerfen der Säule
15. Hinzufügen von 720 µl Ethanol 100% zum Filtrat, Mischen durch Pipettieren
16. Überführen von 700 µl der Probe in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit integrierter RNeasy MinElute spin column, Verschliessen des Gefäßes, Zentrifugieren bei >10 000 rpm für 15 Sekunden, Verwerfen des Filtrats
17. Wiederholung des in Schritt 16 beschriebenen Vorgangs, bis die gesamte Probe das RNeasy MinElute spin column durchlaufen hat
18. Hinzufügen von 500 µl RPE-Puffer ins RNeasy MinElute spin column, Zentrifugieren bei >10 000 rpm für 15 Sekunden, Verwerfen des Filtrats
19. Hinzufügen von 500 µl RPE-Puffer ins RNeasy MinElute spin column, Zentrifugieren bei >10 000 rpm für 2 Minuten
20. Platzieren des RNeasy MinElute spin columns in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß, Verwerfen des alten Reaktionsgefäßes mit dem Filtrat. Zentrifugieren bei voller Geschwindigkeit für 5 Minuten bei geöffnetem Gefäß. Verwerfen des Filtrats.

21. Platzieren des RNeasy MinElute spin columns in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß, Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser, Zentrifugieren bei voller Geschwindigkeit für eine Minute bei geschlossenem Gefäß.

## 10.3 Patientengut

### Normalgewebsproben

<b>Probe Nr.</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>PCR-Resultat (RGE-Mittelwert)</b>
1	Mischling	8 Jahre	27.48
2	Cocker Spaniel	10 Jahre	27.87
3	Cocker Spaniel	7 Jahre	27.24
4	Irish Setter	11 Jahre	31.56
5	Barsoi	10 Jahre	27.63
6	Briard	7 Jahre	28.75
7	Mischling	10 Jahre	31.75
8	Dackel	10 Jahre	28.38
9	Mischling	10 Jahre	31.14
10	Dobermann	5 Jahre	28.87

### Adenomgewebsproben

<b>Probe Nr.</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>PCR-Resultat (RGE-Mittelwert)</b>
11	Dobermann	9 Jahre	34.26
12	Mischling	13 Jahre	29.44
13	Irish Setter*	11 Jahre	35.39
14	Mischling	7 Jahre	27.44
15	Pudel	11 Jahre	30.94
16	Barsoi*	10 Jahre	32.74
17	Malteser	8 Jahre	33.98
18	Dackel*	10 Jahre	28.70
19	Cocker Spaniel	10 Jahre	29.76
20	West Highland White Terrier	8 Jahre	33.55



### Adenokarzinomgewebsproben

<b>Probe Nr.</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>PCR-Resultat (RGE-Mittelwert)</b>
21	Mischling	8 Jahre	28.51
22	Lhasa Apso	13 Jahre	29.92
23	Sibirian Husky	12 Jahre	35.21
24	Mischling*	10 Jahre	31.27
25	Mischling	10 Jahre	26.86
26	Deutscher Schäferhund	11 Jahre	39.69
27	Mischling*	10 Jahre	39.47
28	Pekinese	11 Jahre	33.44
29	Münsterländer	10 Jahre	34.33
30	Samojede	10 Jahre	Nicht auswertbar

\* Von diesen Hunden wurden auch Normalgewebsproben für die Studie verwendet.